

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**TESIS DOCTORAL**

**Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus*  
CECT 4070**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Alba Fresco Taboada**

Directores

María Isabel de la Mata Riesco  
Miguel Arroyo Sánchez

**Madrid, 2014**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**NUCLEÓSIDO 2'-DESOXIRRIBOSILTRANSFERASA  
DE *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074**

**TESIS DOCTORAL**

**ALBA FRESCO TABOADA**

Madrid, 2014





**COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID**

FACULTY OF BIOLOGY

BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY I DEPARTAMENT



**NUCLEOSIDE 2'-DEOXYRIBOSYLTRANSFERASE  
FROM *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT**

**4074**

**DOCTORAL THESIS**

**ALBA FRESCO TABOADA**

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

NUCLEÓSIDO 2'-DESOXIRRIBOSILTRANSFERASA DE  
*Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074

**ALBA FRESCO TABOADA**

Directores de la Tesis Doctoral:

Dra. M<sup>a</sup> Isabel de la Mata Riesco

Dr. Miguel Arroyo Sánchez

Madrid, 2014



## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral no sería posible sin el apoyo, tanto profesional como personal, de muchas personas.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis Directores de Tesis, la Dra. Isabel de la Mata y el Dr. Miguel Arroyo, ya que sin ellos este trabajo no habría sido posible. Gracias a ambos por el apoyo prestado en mis inicios, cuando obteníamos resultados negativos uno tras otro, por los conocimientos que me habéis transmitido a lo largo de estos años y por vuestra ayuda a la hora de planear un experimento o escribir un artículo.

A la Dra. Carmen Acebal, por haber comenzado el grupo de Biotecnología que me ha hecho pasar tan buenos momentos durante este tiempo.

También debo agradecer la financiación de las entidades públicas que han hecho posible que haya realizado una Tesis Doctoral. A la Comunidad de Madrid, a través del proyecto S2009/PPQ-1752 (CAPOTE), y al Ministerio de Ciencia e Innovación mediante el proyecto CTQ2009-11543. Por otra parte, agradezco al Dr. Kaminski del Instituto Pasteur de París por proporcionarme la cepa de *E. coli* PAK6, al Dr. José Luis García y a Carlos del Cerro por su ayuda a la hora de secuenciar y ensamblar el genoma, al Dr. Juan Carlos Alonso por proporcionarme *Bacillus subtilis* BG214, y al Dr. Terreni por brindarme la oportunidad de trabajar tres meses en su laboratorio y por los conocimientos sobre inmovilización transmitidos.

A todos mis compañeros del laboratorio L3: Jesús, Iria, Yohana, Sonia, Miguel, Dani, Javi, Rodrigo, Alma, Patri y Vir porque creo que no podría haber tenido compañeros mejores. Y también por a mis compañeros de Departamento BBMI, Eli, Bar, Jana, Laurita, Carlos, Juanma, Belén, Nuria, Tere, Regina y un largo etcétera...

A tutte le ragazze del Dipartimento di Scienze del Farmaco della Università di Pavia: Giulia, Imma, Dora, Marina, Daniela e Federica; per offrirsi di aiutarmi nel laboratorio.

A todos mis amigos, tanto de Pontevedra como de Madrid, por seguir manteniendo la misma relación que teníamos hace 10 años. A Pablo, por tener siempre la paciencia de aguantar mis charlas sobre ciencia.

Aos meus pais e toda a miña familia, por apoiarme no momento no que decidín facer unha Tesis, ou en calquer eido da vida.









## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	VII
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. Nucleósidos. Conceptos generales.....	3
2. Rutas metabólicas de purinas y pirimidinas.....	4
2.1. Ruta de síntesis <i>de novo</i> de purinas y pirimidinas.....	4
2.2. Ruta de salvamento de purinas y pirimidinas.....	6
3. Enzimas implicadas en la síntesis de nucleósidos .....	9
3.1. Nucleósido fosforilasas (NPs).....	9
3.1.1. Nucleósido fosforilasas tipo I (NP-I) .....	10
3.1.2. Nucleósido fosforilasas tipo II (NP-II) .....	11
3.2. Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas (DRTs) .....	12
4. Análogos de nucleósidos .....	15
4.1. Mecanismo de acción de los análogos de nucleósidos .....	17
5. Microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes .....	19
5.1. <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> (CECT 4074, ATCC 23296, DSM 6).....	20
5.2. Genomas de microorganismos psicrófilos.....	22
6. Inmovilización de enzimas .....	24
6.1. Clasificación de los soportes .....	24
6.2. Inmovilización de enzimas por retención física .....	25
6.2.1. Atrapamiento.....	26
6.2.2. Inclusión en membranas .....	26
6.3. Inmovilización de enzimas por unión química.....	27
6.3.1. Unión a soportes .....	27
6.3.2. Reticulado.....	28
6.4. Efectos de la inmovilización.....	30
6.4.1. Efectos en la estabilidad del derivado inmovilizado .....	30
6.4.2. Efectos en la actividad enzimática.....	30
6.5. Inmovilización en soportes recubiertos con polímeros iónicos .....	31
6.6. Técnicas de post-inmovilización. Entrecruzamiento con dextrano aldehídico ....	33
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
1. Reactivos .....	41

2. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....	43
3. Medios y condiciones de cultivo .....	46
3.1. Medios empleados para el cultivo de los distintos microorganismos.....	46
3.2. Condiciones de cultivo.....	47
3.3. Conservación de las cepas bacterianas .....	47
3.4. Cuantificación del crecimiento de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 en medio líquido .....	47
4. Técnicas de manipulación y análisis de DNA.....	48
4.1. Purificación y secuenciación de DNA.....	48
4.2. Reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR).....	49
4.3. Electroforesis de DNA .....	49
5. Construcción y análisis de una genoteca de <i>B. psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074.....	50
5.1. Cribado funcional.....	50
6. Secuenciación del DNA genómico de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	50
7. Clonación de genes de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074.....	51
7.1. Clonación en pET28a(+) .....	51
7.2. Clonación en pHT01 .....	52
8. Transformación de cepas bacterianas .....	52
8.1. Transformación de cepas de <i>E. coli</i> .....	52
8.2. Transformación de células de <i>Bacillus subtilis</i> .....	53
9. Producción y purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> (BpNDT) .....	53
9.1. Expresión del gen <i>ndt</i> de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	54
9.2. Purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> (BpNDT).....	54
9.3. Purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> (BpNDT) recombinante mediante la introducción de una etiqueta de 6 histidinas (BpNDT <sub>6his</sub> ).....	56
10. Ensayo de actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa .....	56
10.1. Ensayo de actividad empleando células enteras de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> .....	56
10.2. Ensayo de actividad empleando BpNDT pura.....	57
11. Técnicas de análisis de proteínas .....	57
11.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) .....	57

11.2. Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF y análisis de la secuencia amino terminal.....	58
11.3. Determinación de la concentración de proteína .....	58
11.4. Cálculo del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ).....	59
11.5. Estudios de ultracentrifugación analítica .....	59
11.6. Calorimetría diferencial de barrido .....	60
11.7. Espectroscopía de fluorescencia.....	60
11.8. Dicroísmo circular .....	60
11.9. Predicción de la estructura secundaria a través de programas informáticos ....	60
11.10. Modelado de la estructura tridimensional de <i>Bp</i> NDT .....	61
12. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de <i>Bp</i> NDT .....	61
12.1. Estudios de termoinactivación de <i>Bp</i> NDT .....	62
13. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de <i>Bp</i> NDT .....	62
14. Efecto de la fuerza iónica y la presencia de cationes sobre la actividad de <i>Bp</i> NDT .....	62
15. Estudio de la especificidad de sustrato de <i>Bp</i> NDT .....	63
16. Determinación de los parámetros cinéticos de <i>Bp</i> NDT .....	64
16.1. Parámetros cinéticos a distintos valores de pH.....	65
17. Cristalización de <i>Bp</i> NDT .....	65
17.1. Proceso de cristalización.....	65
17.2. Difracción de rayos X .....	66
18. Mutagénesis dirigida de residuos del centro activo de <i>Bp</i> NDT .....	67
19. Inmovilización de <i>Bp</i> NDT .....	68
19.1. Inmovilización covalente .....	68
19.2. Inmovilización por interacción iónica .....	68
19.2.1. Entrecruzamiento con dextrano aldehídico .....	69
19.3. Ensayo de actividad de <i>Bp</i> NDT inmovilizada .....	69
19.4. Estudios de estabilidad de <i>Bp</i> NDT inmovilizada.....	70
19.5. Reutilización del biocatalizador inmovilizado.....	70
19.6. Efecto de la temperatura sobre el derivado inmovilizado .....	70
19.7. Síntesis de nucleósidos no naturales de interés terapéutico .....	71
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
1. Aislamiento y purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	75
1.1. Estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	75

1.2. Determinación de la actividad 2'-desoxirribosiltransferasa en células de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	76
1.3. Purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	77
2. Aislamiento, clonación y expresión del gen <i>ndt</i> de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	82
2.1. Identificación y expresión del gen <i>ndt</i> a partir de una genoteca de <i>B. psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	82
2.1.1. Construcción de una genoteca de <i>B. psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 y cribado funcional empleando <i>E. coli</i> PAK6.....	82
2.1.2. Clonación y expresión del hipotético gen <i>ndt</i> de <i>B. psychrosaccharolyticus</i> ( <i>hBpndt</i> ) en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	86
2.1.3. Clonación y expresión del gen <i>hBpndt</i> en <i>Bacillus subtilis</i> .....	89
2.2. Identificación, clonación y expresión del gen <i>ndt</i> a partir de la secuencia del DNA genómico de <i>B. psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	90
2.2.1. Secuenciación del DNA genómico de <i>B. psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	91
2.2.2. Localización del gen <i>ndt</i> en el genoma de <i>B. psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 .....	93
2.2.3. Clonación y expresión del gen <i>ndt</i> en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	95
3. Purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074 recombinante ( <i>BpNDT</i> ) expresada en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)97	
3.1. Análisis de la secuencia amino terminal de la <i>BpNDT</i> recombinante .....	101
3.2. Determinación del tipo de nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa.....	101
4. Caracterización funcional de <i>BpNDT</i> .....	102
4.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de <i>BpNDT</i> .....	102
4.2. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de <i>BpNDT</i> .....	103
4.3. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de <i>BpNDT</i> .....	104
4.4. Influencia de la presencia de cationes sobre la actividad de <i>BpNDT</i> .....	105
4.5. Estudio de la especificidad de sustrato de <i>BpNDT</i> .....	106
4.5.1. Síntesis de nucleósidos naturales .....	106
4.5.2. Síntesis de nucleósidos no naturales .....	108
4.6. Determinación de los parámetros cinéticos de <i>BpNDT</i> .....	109
4.7. Variación de la $k_{cat}$ con el pH .....	111
4.8. Estudios de inactivación térmica de <i>BpNDT</i> .....	112
5. Caracterización estructural de <i>BpNDT</i> .....	113
5.1. Cálculo del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ).....	113

5.2. Determinación de la masa molecular y estado de oligomerización de <i>Bp</i> NDT..	113
5.3. Determinación de la estructura secundaria de <i>Bp</i> NDT .....	114
5.4. Determinación de la temperatura de desnaturalización ( <i>T<sub>m</sub></i> ) .....	116
5.5. Modelado y estructura tridimensional de <i>Bp</i> NDT .....	119
5.6. Cristalización de <i>Bp</i> NDT .....	121
6. Identificación de los residuos del centro activo de <i>Bp</i> NDT mediante mutagénesis dirigida .....	125
6.1. Producción y purificación de <i>Bp</i> NDT marcada con etiqueta de histidinas.....	125
6.2. Mutagénesis dirigida de <i>Bp</i> NDT con etiqueta de histidinas .....	127
7. Inmovilización de <i>Bp</i> NDT .....	128
7.1. Inmovilización covalente en glioxil-agarosa .....	128
7.2. Inmovilización de <i>Bp</i> NDT en soportes funcionalizados con polietilenimina .....	129
7.3. Estudio de estabilidad de los derivados de <i>Bp</i> NDT inmovilizada .....	132
7.3.1. Estabilidad a pH 10.....	132
7.3.2. Estabilidad en dimetilformamida 20 %.....	133
7.4. Reutilización del biocatalizador inmovilizado.....	134
7.5. Efecto de la temperatura sobre el derivado inmovilizado .....	135
7.6. Síntesis de nucleósidos no naturales .....	137
V. DISCUSIÓN .....	139
1. <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074, un microorganismo psicrotolerante con actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo II .....	143
2. <i>Bp</i> NDT, una enzima psicrotolerante de la familia de las glicosiltransferasas tipo II .....	148
3. Dilucidación del mecanismo catalítico de <i>Bp</i> NDT. ....	154
4. Aplicaciones biotecnológicas de <i>Bp</i> NDT. Síntesis de nucleósidos de interés terapéutico.....	158
VI. CONCLUSIONES .....	167
VII. CONCLUSIONS .....	171
VIII. REFERENCIAS .....	175
IX. SUMMARY FOR THE EUROPEAN DOCTORATE MENTION.....	189



## ABREVIATURAS

2-FAde	2-Fluoroadenina
2'-FaraUra	2'-Fluoro-arabinosil-uracilo
2-FdAdo	2-Fluoro-2'-desoxiadenosina
2,6-DAP	2,6-Diaminopurina
2,6-DAPdRib	2,6-Diaminopurina-2'-desoxirribosa
4-HMMeP	4-Hidroxi-2-mercapto-6-metilpirimidina
5-azaCyt	5-Azacitosina
5-azadCyd	5-Aza-2'-desoxicitidina
5-azaUra	5-Azauracilo
5-azadUrd	5-Aza-2'-desoxiuridina
5-BrdUrd	5-Bromo-2'-desoxiuridina
5-BrUra	5-Bromouracilo
5-CldUrd	5-Cloro-2'-desoxiuridina
5-ClUra	5-Clorouracilo
5-EtdUrd	5-Etil-2'-desoxiuridina
5-EtUra	5-Etiluracilo
5-FCyt	5-Fluorocitosina
5-FdCyd	5-Fluoro-2'-desoxicitidina
5-FdUrd	5-Fluoro-2'-desoxiuridina
5-FMP	5-Fluoro-2-metoxi-4(1H)pirimidinona
5-FMPdRib	5-Fluoro-2-metoxi-4(1H)pirimidinona-2'-desoxirribósido
5-FUra	5-Fluorouracilo
5-HMedUrd	5-Hidroximetil-2'-desoxiuridina
5-HMeUra	5-Hidroximetiluracilo
5-IdUrd	5-Yodo-2'-desoxiuridina
5-IUra	5-Yodouracilo
5-MeCyt	5-Metilcitosina
5-MedCyd	5-Metil-2'-desoxicitidina
5-TFThd	5-Trifluorotimidina
5-TFTHy	5-Trifluorotimina
6-M	6-Mercaptopurina
6-MdRib	6-Mercaptopurina-2'-desoxirribósido
6-MeUra	6-Metiluracilo
6-PTUra	6-Propil-2-tiouracilo
7-DHP	7-Deaza-6-hidroxipurina
7-DHPdRib	7-Deaza-6-hidroxipurina-2'-desoxirribósido
Ade	Adenina
AhPNP	Purina nucleósido fosforilasa de <i>Aeromonas hydrophila</i>
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
araA	Arabinosil-adenina
araH	Arabinosil-hipoxantina
araU	Arabinosil-uracilo
AZT	3'-Azido-2',3'-didesoxitimidina
B	Benzimidazol
BdRib	Benzimidazol-2'-desoxirribósido
BsPNP	Purina nucleósido fosforilasa de <i>Bacillus subtilis</i>
BsPyNP	Pirimidina nucleósido fosforilasa de <i>Bacillus subtilis</i>
BpNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>
Cp	Capacidad calorífica



c(s)	Distribución de coeficientes de sedimentación
CTP	Citidina 5'-monofosfato
Cyt	Citosina
dAdo	2'-Desoxiadenosina
DC	Dicroísmo circular
dCyd	2'-Desoxicitidina
DFC	2'-Fluoro-2'-desoxicitidina
dFCyd	2'-Desoxi-2',2'-difluorocitidina
DFU	2'-Fluoro-2'-desoxiuridina
dGua	2'-Desoxiguanosina
dIno	2'-Desoxiinosina
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DpNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Desulfotalea psychrophila</i>
DRT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
dTeo	Teofilina-2'-desoxirribósido
dUrd	2'-Desoxiuridina
EcTP	Timidina fosforilasa de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPLC	Cromatografía líquida de rápida resolución ( <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> )
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
Hyp	Hipoxantina
I <sub>F</sub>	Intensidad de fluorescencia
IMP	Inosina 5'-monofosfato
Ino	Inosina
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
$k_{cat}$	Constante catalítica
$k_{cat}/K_m$	Eficacia catalítica
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
$\lambda_{exc}$	Longitud de onda de excitación
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LcNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo II de <i>Lactococcus lactis</i>
LfNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo II de <i>Lactobacillus fermentum</i>
LhNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo II de <i>Lactobacillus helveticus</i>
LhPDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo I de <i>Lactobacillus helveticus</i>
L/NDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo II de <i>Lactobacillus leichmannii</i>
LrNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo II de <i>Lactobacillus reuteri</i>
N-BAde	N-benzoiladenina
NDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo II
O-dMeCyd	2'-O-metil-5-metilcitidina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDB	Protein Data Bank
PDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo I
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
pl	Punto isoeléctrico

pKa	Logaritmo negativo en base 10 de la constante de disociación ácida
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PNP	Purina nucleósido transferasa
PRPP	5-Fosfo- $\alpha$ -D-ribosil-1-pirofosfato
PyNP	Pirimidina nucleósido transferasa
RNA	Ácido ribonucleico
r.p.m	Revoluciones por minuto
s	Coefficiente de sedimentación
SDS	Dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
TAE	Tampón Tris HCl-ácido acético-EDTA
TE	Tampón Tris HCl-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Teo	Teofilina
Thd	Timidina
Thy	Timina
Tm	Temperatura de desnaturalización
TMP	Timidina 5'-monofosfato
TP	Timidina fosforilasa
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TyNP	Timidina nucleósido fosforilasa
Uac	Ácido úrico
UI	Unidades internacionales de actividad enzimática
UMP	Uridina 5'-monofosfato
UP	Uridina fosforilasa
Ura	Uracilo
Urd	Uridina
VHS	Virus del herpes simple
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima

### Aminoácidos

Código 1 letra	Código 3 letras	Aminoácido
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

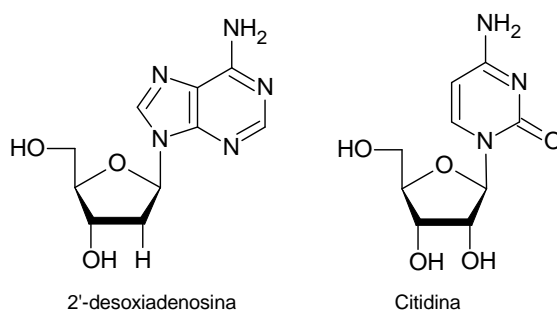


# **I. INTRODUCCIÓN**



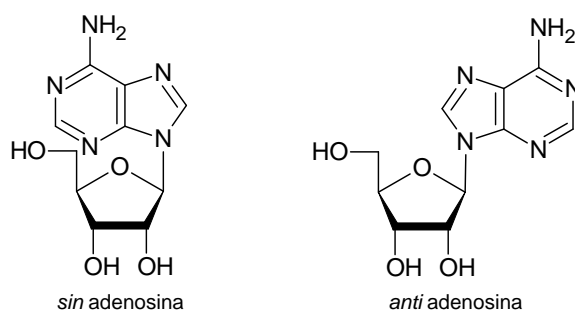
## 1. Nucleósidos. Conceptos generales

Los nucleósidos están constituidos por una ribosa o desoxirribosa y una base heterocíclica, que puede ser una purina (adenina, guanina) o una pirimidina (citosina, timina, uracilo). El C1 del azúcar forma un enlace  $\beta$ -N-glucosídico con el N1 de las pirimidinas o el N9 de las purinas. (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura de dos nucleósidos naturales.

Los nombres de los nucleósidos derivan de las bases que forman parte de ellos. Así, el ribonucleósido que contiene adenina se llama adenosina (Ado); mientras que su equivalente sin el grupo hidroxilo en la posición 2' se denomina 2'-desoxiadenosina (dAdo). Respecto a la rotación alrededor del enlace glucosídico, en los nucleósidos púricos las conformaciones *sin* y *anti* están en equilibrio; mientras que en los pirimidínicos predomina la configuración *anti* (Figura 2) (Horton et al, 1996).



**Figura 2.** Conformaciones *sin* y *anti* de la adenosina.

Los nucleósidos son compuestos endógenos que están implicados en varios procesos celulares como la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA), la señalización celular, la regulación enzimática y el metabolismo.

## 2. Rutas metabólicas de purinas y pirimidinas

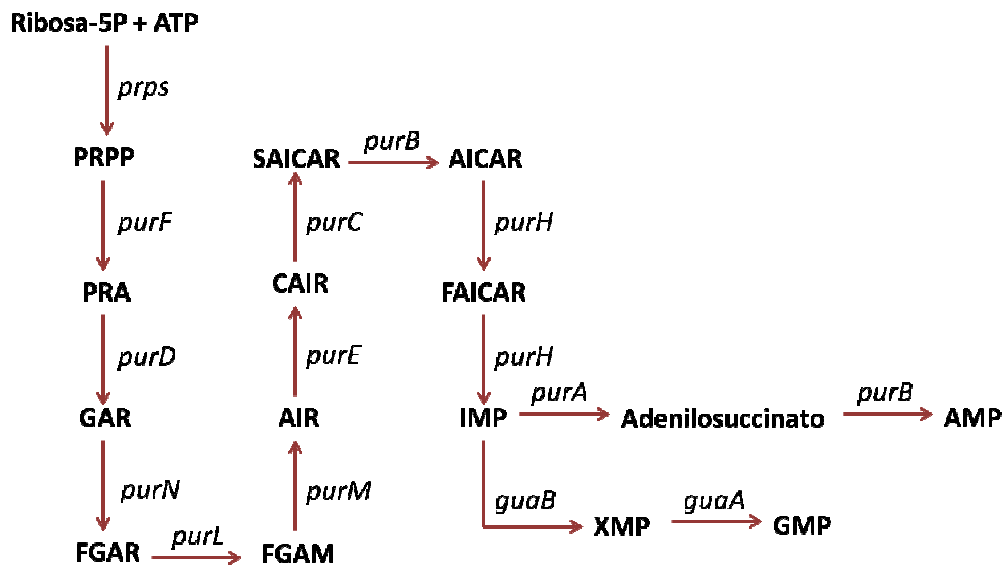
Las bases púricas y pirimidínicas siempre están presentes en las células formando parte de nucleótidos y polinucleótidos. Algunos nucleótidos, como el ATP, funcionan como co-sustratos, mientras que otros, como el AMP cíclico, son reguladores. Prácticamente todos los organismos y tejidos pueden sintetizar nucleótidos púricos y pirimidínicos, lo cual refleja la importancia de estas moléculas.

Los nucleótidos púricos y pirimidínicos se pueden sintetizar *de novo*, a partir de precursores de bajo peso molecular; o mediante rutas de salvamento o recuperación, es decir, intracelularmente a partir de la degradación enzimática de los ácidos nucleicos o extracelularmente a través del alimento ingerido (Horton et al, 1996).

### 2.1. Ruta de síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas

En la ruta de síntesis *de novo* de las purinas, el anillo púrico no es sintetizado como base libre, sino como sustituyente de la ribosa-5-fosfato. La ribosa-5-fosfato procede del 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), que dona la ribosa-5-fosfato para que sirva como estructura inicial sobre la que se construya la purina. El producto final de la ruta biosintética de purinas es la inosina-5'-monofosfato (IMP), que puede ser convertida a cualquiera de los otros dos nucleótidos púricos, AMP o GMP, requiriendo en ambos casos dos reacciones enzimáticas. Por último, AMP y GMP pueden ser fosforilados a sus formas di- y trifosfato mediante nucleósido monofosfato quinasas o nucleósido difosfato quinasas específicas (Figura 3).

La síntesis de nucleótidos púricos se encuentra regulada en las células mediante inhibición por producto, por ejemplo, la PRPP sintasa es inhibida por diversos ribonucleótidos púricos, pero sólo a concentraciones más altas a aquellas que se encuentran habitualmente en la célula (Horton et al, 1996).

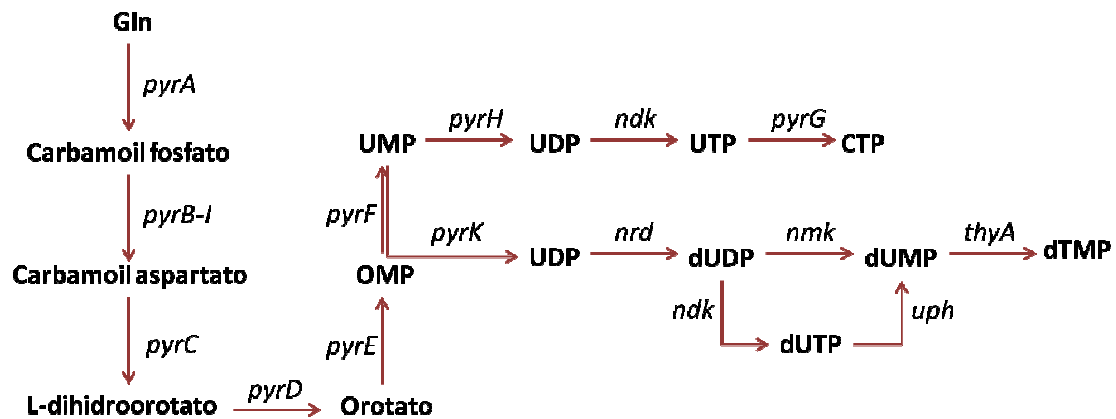


**Figura 3.** Representación esquemática de la ruta de síntesis *de novo* de purinas en *E. coli*. Las enzimas de la ruta se representan por los nombres de los genes que las codifican. *prps*, PRPP sintasa; *purF*, glutamina-PRPP amidotransferasa; *purD*, GAR sintasa; *purN*, GAR transformilasa; *purL*, FGAM sintasa; *purM*, AIR sintasa; *purE*, AIR carboxilasa; *purC*, SAICAR sintasa; *purB*, adenilosuccinato liasa; *purH*, AICAR transformilasa e IMP ciclohidrolasa; *purA*, adenilosuccinato sintasa; *guaB*, IMP deshidrogenasa; *guaA*, GMP sintasa; PRPP, 5-fosfo- $\alpha$ -D-ribosil-1-pirofosfato; PRA, 5-fosfo- $\beta$ -D-ribosilamina; GAR, glicinamida ribonucleótido; FGAR, formilglicinamida ribonucleótido; FGAM, formilglicinamidina ribonucleótido; AIR, aminoimidazol ribonucleótido; CAIR, carboxiaminoimidazol ribonucleótido; SAICAR, aminoimidazol succinilcarboxamida ribonucleótido; AICAR, aminoimidazol carboxamida ribonucleótido; FAICAR, formamidoimidazol carboxamida ribonucleótido.

La ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas es más simple que la de síntesis de purinas. Los dos primeros pasos generan un intermedio no cíclico que contiene todos los átomos que formarán el anillo de pirimidina. Este intermedio, carbamoil aspartato, se cicla enzimáticamente y el producto, dihidroorotato, es oxidado y fosforilado a orotidina 5'-monofosfato (OMP), que es a su vez descarboxilado para formar UMP. Este nucleótido pirimidínico es el precursor de todos los ribo y desoxirribonucleótidos pirimidínicos (Figura 4).

La citidina 5'-trifosfato (CTP) se forma a partir de UMP mediante tres etapas, mientras que la timidina 5'-monofosfato (TMP) requiere cuatro pasos para su síntesis, entre los que se encuentra la reducción mediante la ribonucleótido reductasa (Horton et al, 1996).

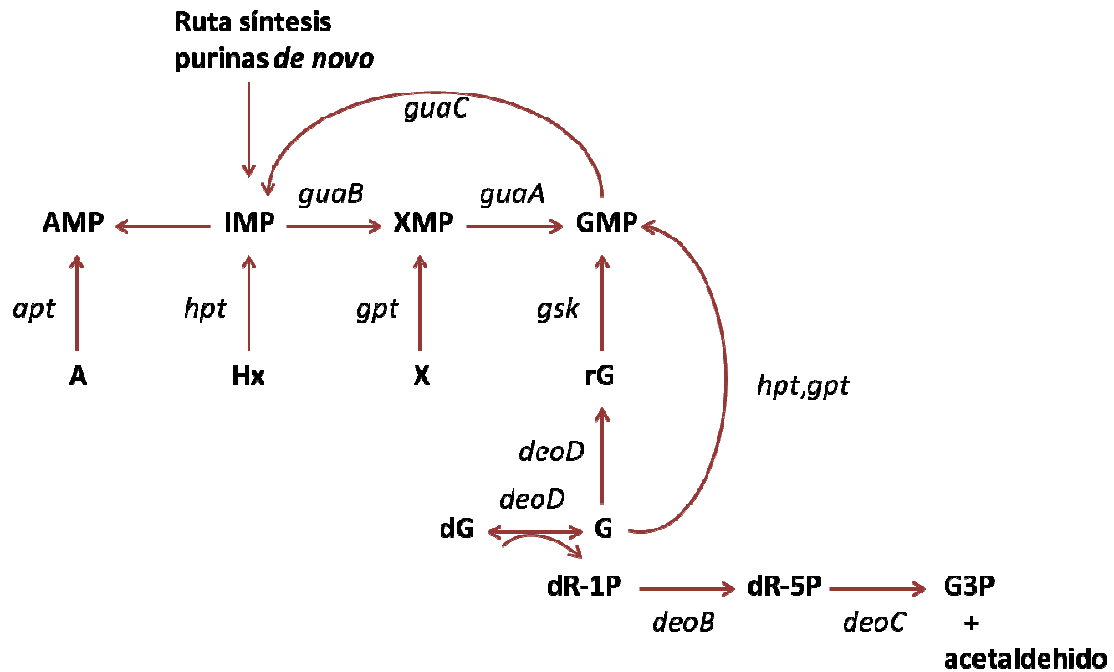




**Figura 4.** Representación esquemática de la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas en *E. coli*. Las enzimas de la ruta se representan por los nombres de los genes que las codifican: *pyrA*, carbamoil fosfato sintasa; *pyrB-l*, aspartato transcarbamilasa; *pyrC*, dihidroorotasa; *pyrD*, dihidroorotato deshidrogenasa; *pyrE*, orotato fosforribosiltransferasa; *pyrF*, OMP descarboxilasa; *pyrH*, UMP quinasa; *ndk*, nucleósido difosfato quinasa; *pyrG*, CTP sintasa; *pyrK*, UMP quinasa; *nrd*, ribonucleótido reductasa; *nmk*, nucleósido monofosfato quinasa; *thyA*, timidilato sintasa; *ndk*, nucleósido difosfato quinasa; *uph*, dUTP difosfohidrolasa.

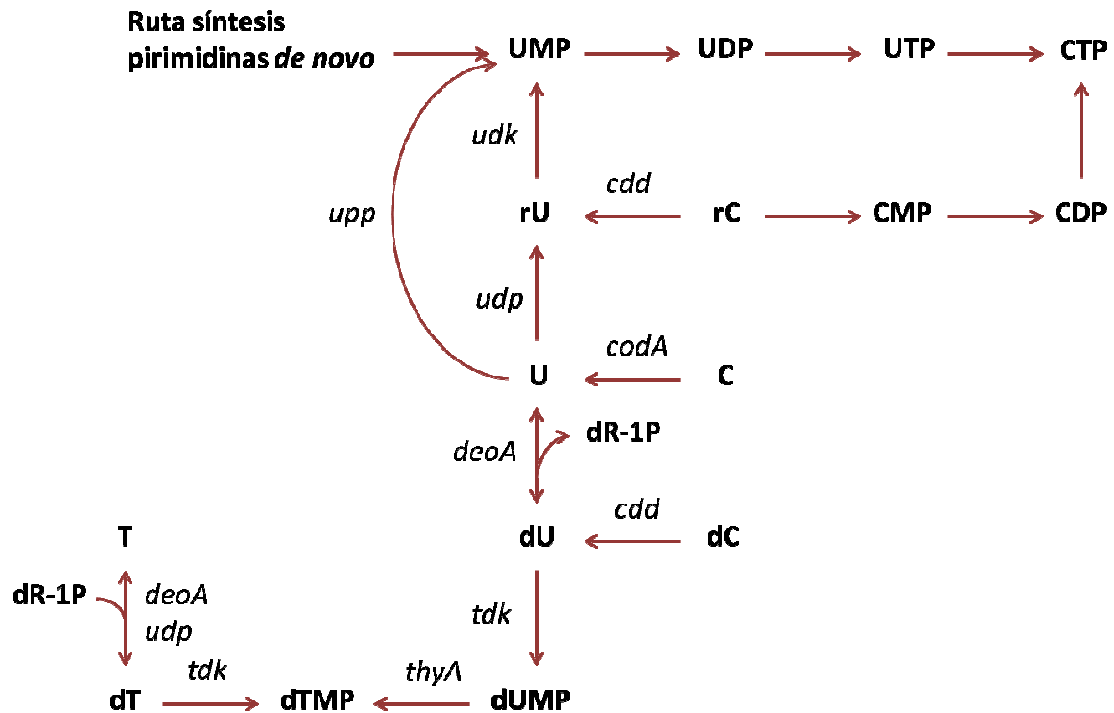
## 2.2. Ruta de salvamento de purinas y pirimidinas

Durante el metabolismo celular los ácidos nucleicos son degradados a mononucleótidos, nucleósidos y en algunos casos a las bases heterocíclicas. Las reacciones catabólicas están catalizadas por ribonucleasas, desoxirribonucleasas, nucleotidasas, fosfatasas y nucleósido fosforilasas. Algunas de las bases púricas y pirimidínicas formadas son degradadas a moléculas más sencillas (por ejemplo, las purinas se degradan a ácido úrico), pero un porcentaje elevado es convertido directamente a 5'-mononucleótidos, conservando energía celular (Horton et al, 1996). En las figuras 5 y 6 se observan las rutas de salvamento de purinas y pirimidinas en *E. coli*.



**Figura 5.** Representación esquemática de las rutas de salvamento de purinas en *E. coli*. Las enzimas de la ruta se representan por los nombres de los genes que las codifican: *guaB*, IMP deshidrogenasa; *guaA*, GMP sintetasa; *guaC*, GMP reductasa; *apt*, adenosina fosforribosiltransferasa; *gpt*, guanosina fosforribosiltransferasa; *hpt*, hipoxantina fosforribosiltransferasa; *gsk*, guanosina quinasa; *deoD*, purina nucleósido fosforilasa; *deoB*, fosfopentomutasa; *deoC*, desoxirriboaldolasa; X, xantina; G, guanina; rG, guanosina; dG, desoxiguanosina; DR-1P, desoxirribosa-1-fosfato; DR-5P, desoxirribosa-5-fosfato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato (Kaminski, 2002).

Los 2'-desoxirribonucleósidos púricos monofosfato pueden ser generados directamente a partir de la base a través de fosforribosiltransferasas o interconvertirse entre ellos a través de GMP reductasa/sintetasa o IMP deshidrogenasa. La guanina aceptada por la guanosina fosforribosiltransferasa puede proceder del catabolismo de la desoxiguanosina a través de la purina nucleósido transferasa.



**Figura 6.** Representación esquemática de las rutas de salvamento de pirimidinas en *E. coli*. Las enzimas de la ruta se representan por los nombres de los genes que las codifican: *thyA*, timidilato sintasa; *tdk*, timidina quinasa; *deoA*, timidina fosforilasa; *udp*, uridina fosforilasa; *upp*, uracilo fosforribosiltransferasa; *udk*, uridina quinasa; *cdd*, citidina desaminasa; *coda*, citosina desaminasa; U, uracilo; C, citosina; T, timina; dU, desoxiuridina; dT, desoxitimidina; dC, desoxicitidina; rU, uridina, rC, citidina (Kaminski, 2002).

En la ruta de recuperación de pirimidinas, el uracilo se puede obtener a partir de la citosina o desoxicitidina, mediante la citosina/citidina desaminasa. A continuación, la uracilo fosforribosiltransferasa transforma el uracilo en UMP, aunque puede obtenerse también por la acción de la uridina fosforilasa y uridina quinasa. Los (desoxi)nucleósidos fosforilados de timina y citosina se generan a partir de UMP.

El salvamento de purinas y pirimidinas utiliza reacciones de fosforribosiltransferasas que generan ribonucleósidos monofosfato a partir de las bases y el PRPP. Tras la fosforilación a nivel trifosfato, estos compuestos penetran en el metabolismo de los ribonucleótidos y mediante reducción enzimática se generan los 2'-desoxirribonucleósidos trifosfato. En la mayoría de los organismos esta reducción ocurre a través de la ribonucleótido reductasa independientemente del ribonucleótido a reducir. Al reducirse el enlace disulfuro presente en su centro activo la enzima se activa y puede reducir el C2 de la ribosa a desoxirribosa.

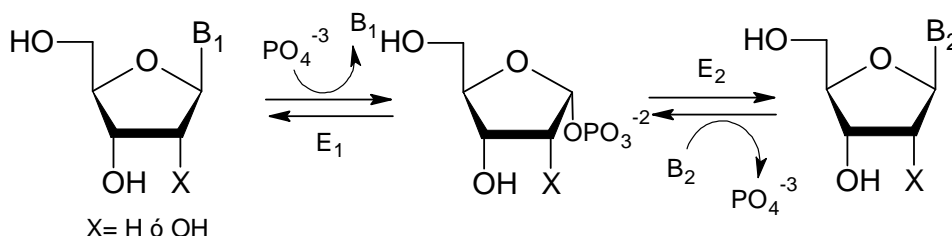
Además, las rutas de salvamento constituyen objetivos importantes para el tratamiento de enfermedades microbianas o parasitarias y puntos estratégicos para la manipulación de los sistemas biológicos. Por ejemplo, protozoos parásitos como *Plasmodium* o *Leishmania* carecen de la capacidad de síntesis de purinas de novo, y dependen totalmente del salvamento de los nucleósidos y bases que les proporciona el hospedador. Compuestos como el alopurinol y la formicina B inhiben el crecimiento de estos microorganismos, en parte por inhibición de las enzimas de salvamento y en parte por la capacidad de las enzimas de esta ruta de anabolizar el análogo, capacidad de la que carecen las correspondientes enzimas del hospedador (Mathews et al, 2002).

### 3. Enzimas implicadas en la síntesis de nucleósidos

Existen dos clases de enzimas que sintetizan nucleósidos mediante transferencia de un grupo glicosil a una base aceptora: las nucleósido fosforilasas y las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas.

#### 3.1. Nucleósido fosforilasas (NPs)

Las nucleósido fosforilasas (NPs) son transferasas que catalizan la hidrólisis reversible del enlace glicosídico de ribo- y 2'-desoxirribonucleósidos, en presencia de fosfato inorgánico, para generar una base y ribosa- o 2'-desoxirribosa-1-fosfato. En presencia de una segunda nucleobase aceptora y de una segunda nucleósido fosforilasa se formará un nuevo nucleósido. Es decir, son necesarias dos nucleósido fosforilasas para completar la reacción de transglicosilación debido a la especificidad de estas enzimas respecto a la base (Figura 7). Las NPs se encuentran abundantemente en procariotas, levaduras y organismos superiores (Bzowska et al, 2000).



**Figura 7.** Reacción catalizada por nucleósido fosforilasas. Donde B1: pirimidina, E1: pirimidina nucleósido fosforilasa, B2: purina, E2: purina nucleósido fosforilasa; o bien B1: purina, E1: purina nucleósido fosforilasa, B2: pirimidina, E2: pirimidina nucleósido fosforilasa.

Las nucleósido fosforilasas se pueden clasificar en dos familias (Pugmire et al, 2002):

Las *nucleósido fosforilasas tipo I* (NP-I) se caracterizan por tener un dominio  $\alpha/\beta$  común y presentan estructura cuaternaria trimérica o hexamérica. Los miembros de esta familia reconocen ribo y desoxirribonucleósidos púricos o pirimidínicos y aceptan purinas o pirimidinas como segunda nucleobase.

Las *nucleósido fosforilasas tipo II* (NP-II) tienen estructura cuaternaria dimérica, y cada subunidad consiste en un pequeño dominio  $\alpha$  separado de un dominio  $\alpha/\beta$  más grande. Miembros de organismos inferiores reconocen timidina o uridina, mientras que las de especies superiores son específicas de timidina.

### 3.1.1. Nucleósido fosforilasas tipo I (NP-I)

#### Purina nucleósido fosforilasa (PNP)

Las purina nucleósido fosforilasas (EC 2.4.2.1) son el miembro más estudiado de la familia NP-I. Han sido aisladas y caracterizadas en un gran número de especies mamíferas (cerebro bovino, hígado de conejo, bazo de ternera o hámster) y bacterianas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Sulfolobus solfataricus*, *Erwinia carotovora* o *Bacillus cereus*), y se clasifican en dos categorías principales (Bzowska et al, 2000; Pugmire et al, 2002):

- Homotrímeros de bajo peso molecular (80-100 kDa), específicas para 6-oxopurinas y sus nucleósidos (guanosina e inosina como nucleósidos naturales). Enzimas de este tipo se encuentran en tejidos mamíferos y en microorganismos como *Bacillus stearothermophilus* (Hamamoto et al, 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (Nolasco et al, 2004) o *Geobacillus stearothermophilus* B-2194 (Taran et al, 2009).
- Homohexámeros de alto peso molecular (110-160 kDa), que aceptan 6-oxo, 6-amino purinas y sus nucleósidos (guanosina, adenosina e inosina como nucleósidos naturales). Se encuentran únicamente en microorganismos, como *Aeromonas hydrophila* (Ubiali et al, 2012) o *Sulfolobus solfataricus* (Cacciapuoti et al, 1994).

Diversas PNPs han sido cristalizadas, como la de *Bacillus subtilis* (BsPNP, PDB 4DAO) o la PNP humana (HPNP, PDB 1RCT). BsPNP es un hexámero, dispuesto como trímero de dímeros, cuyas subunidades se disponen alrededor de un eje central y que presenta seis centros activos. Cada subunidad interacciona con las subunidades adyacentes formando dos interfases: la catalítica, que contiene el centro activo, y la inter-dimérica, implicada en la estabilización del hexámero (de Giuseppe et al, 2012). Por el contrario, HPNP presenta estructura trimérica, cada

monómero está formado por un barril  $\beta$  rodeado por  $\alpha$ -hélices, y el ligando se une a las regiones inter-monoméricas (Canduri et al, 2004).

### **Uridina fosforilasa (UP)**

La uridina fosforilasa (EC 2.4.2.3) es específica para nucleósidos pirimidínicos, presentando mayor afinidad por los ribósidos que por los desoxiribósidos y por el uracilo que por el resto de bases. Todas las UPs conocidas pertenecen a esta familia, aunque las de mamífero presentan estructura dimérica y las bacterianas hexamérica.

Los sitios de unión de la ribosa y del fosfato son similares a los de la PNP de *E. coli*, pero la UP presenta especificidad por pirimidinas debido al pequeño sitio de unión de la base, haciendo que las purinas no puedan entrar en el mismo (Lewkowicz et al, 2006).

Numerosas UPs han sido descritas, así como cristalizadas, como la de *Escherichia coli* (EcUP, PDB 1LX7) o la de *Vibrio cholerae* (VcUP, PDB 3O6V). Ambas uridina fosforilasas son hexámeros, aunque EcUP debe ser considerado un trímero de dímeros, donde cada dímero contiene dos centros activos formados por residuos de ambas subunidades del dímero (Caradoc-Davies et al, 2004; Prokofev et al, 2014).

### **3.1.2. Nucleósido fosforilasas tipo II (NP-II)**

#### **Timidina fosforilasa (TP)**

La timidina fosforilasa (EC 2.4.2.4) es la enzima más abundante de esta familia. La selectividad por el grupo desoxirribosa, al igual que por la pirimidina con sustituyentes en posición 5', varía entre especies. En todos los casos la estructura de TP es dimérica y su tamaño varía entre los 80 kDa en *Lactobacillus casei* (Avraham et al, 1990) y los 110 kDa en plaquetas sanguíneas humanas (Desgranges et al, 1981). También se encuentra en *E. coli*, la cual ha sido cristalizada (EcTP, PDB 1TPT).

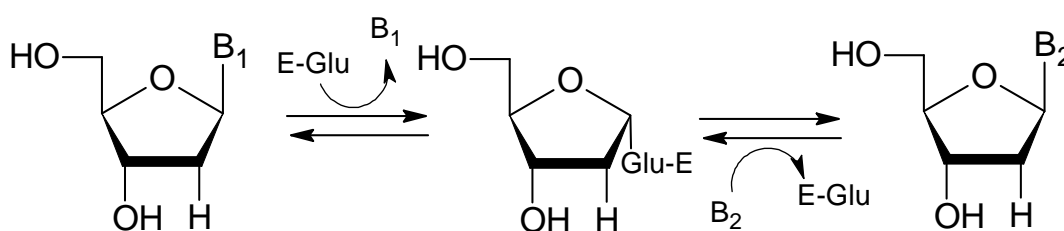
La TP humana (hTP), identificada en principio como el factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF, gliostatina), es capaz de estimular la proliferación celular endotelial a través de la formación de 2'-desoxi-D-ribosa, compuesto resultante de la fosforólisis de la timidina. La estructura tridimensional de esta enzima ha sido resuelta (PDB 2WK6) (Mitsiki et al, 2009). Este descubrimiento ha estimulado la búsqueda de inhibidores de TP que puedan ser empleados en quimioterapia para el tratamiento del cáncer (Mikhailopulo et al, 2011).

### Pirimidina nucleósido fosforilasa (PyNP)

La pirimidina nucleósido fosforilasa (EC 2.4.2.2) no es específica de la posición 2' del azúcar, acepta tanto ribosa como 2'-desoxirribosa, y reconoce tanto timidina como uridina. Además, presenta gran similitud de secuencia con la TP y tiene propiedades físicas muy similares a la misma (Pugmire et al, 2002). La PyNP de *Staphylococcus aureus* (PDB 3H5Q) y de *Bacillus stearothermophilus* (BsPyNP, PDB 1BRW) han sido cristalizadas, presentando ambas estructura dimérica. BsPyNP presenta estructura tridimensional muy similar a EcTP, el dímero constituye la unidad funcional, interaccionando las cadenas laterales de los residuos de una subunidad con las del otro monómero (Pugmire et al, 2002).

### 3.2. Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas (DRTs)

Las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas (EC 2.4.2.6) catalizan el intercambio de 2'-desoxirribosa entre una base púrica o pirimidínica y una purina o pirimidina libre (Holguin et al, 1975a) (Figura 8).



**Figura 8.** Reacción de transglicosilación catalizada por las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas. B1: purina o pirimidina; B2: purina o pirimidina.

La reacción se lleva a cabo a través de la formación de un intermediario covalente en el que el hidroxilo glicosídico de la 2'-desoxirribosa es esterificado por el ácido glutámico del sitio activo de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas. Estas enzimas son específicas de 2'-desoxirribósidos, regioselectivas (glicosilación a través del N1 de pirimidinas y N9 de purinas) y estereoselectivas (se forma únicamente el anómero β) (Huang et al, 1983). La glicotransferencia tiene lugar a través de un mecanismo Ping-Pong Bi-Bi y, a diferencia de las nucleósido fosforilasas, la reacción transcurre en un solo paso con una única enzima (Holguin et al, 1975b).

Las NDTs se pueden clasificar en dos grupos en función de la especificidad de sustrato:

·*Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas tipo I (PDT)*: específicas para bases púricas.

·*Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas tipo II (NDT)*: catalizan la transglicosilación independientemente del tipo de base, entre purinas y/o pirimidinas, aunque presentan preferencia por las pirimidinas.

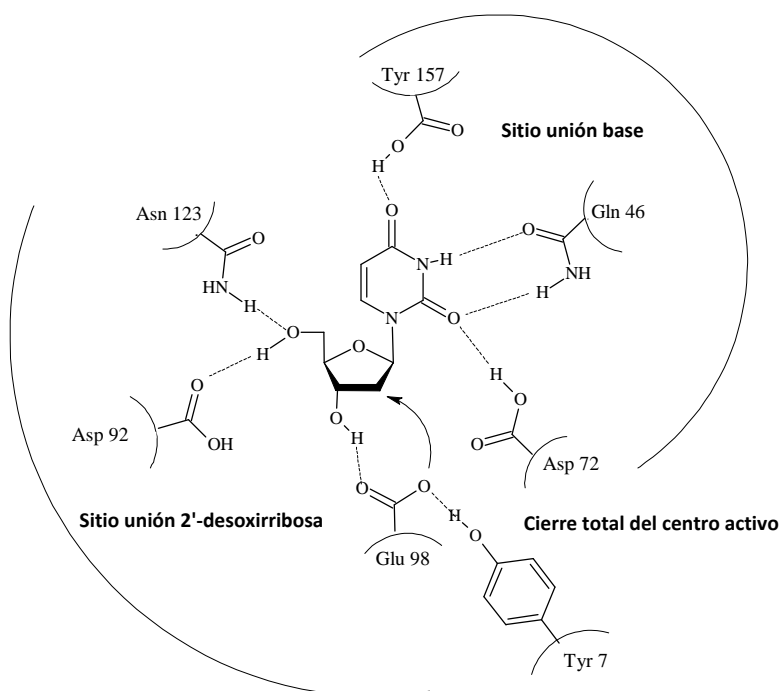
Se han descrito distintas nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas, muchas de ellas de lactobacilos (Fernández-Lucas et al, 2010; Kaminski, 2002; Macnutt, 1952), aunque también de *Lactococcus lactis* (Miyamoto et al, 2007), de microorganismos patógenos como *Borrelia burgdorferi* (Lawrence et al, 2009) o de protozoos como *Trypanosoma brucei* (Bosch et al, 2006). De aquellas de las que se conoce la estructura, la mayoría son homohexámeros (Anand et al, 2004; Cook et al, 1990; Fernández-Lucas et al, 2010), con excepción de la NDT tetramérica de *Lactococcus lactis* (LcNDT) (Miyamoto et al, 2007).

La cristalización de nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas, como la de tipo II de *Lactobacillus leichmannii* (PDB 1F8X) o la de tipo I de *Lactobacillus helveticus* (PDB 1S2L) ha revelado que las DRTs presentan dominios  $\alpha/\beta$  y, aunque hay un centro activo en cada subunidad, el sitio activo completo requiere las cadenas laterales de residuos situados en dos subunidades distintas orientadas de forma antiparalela.

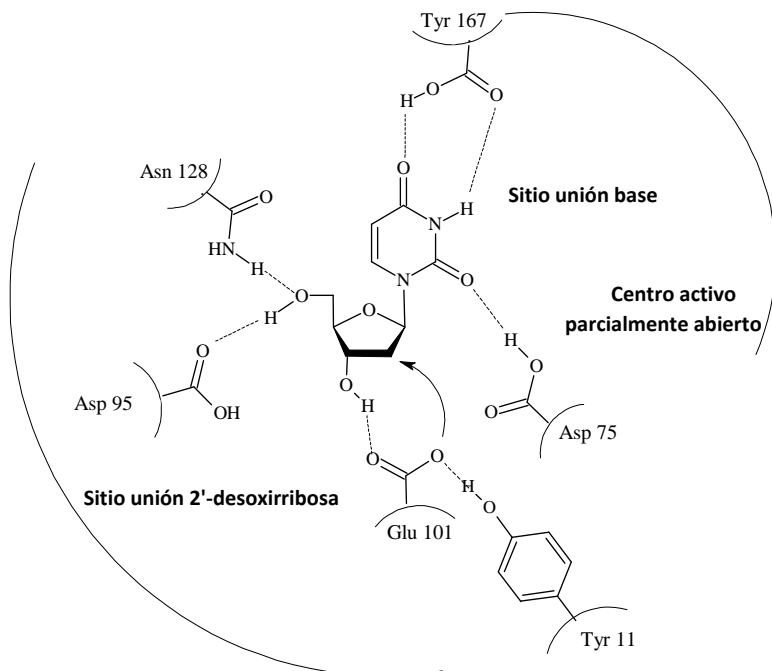
Las DRTs aceptan distintas bases naturales y no naturales, pero son altamente específicas para la 2'-desoxirribosa, ya que la interacción del OH en posición 2' con el residuo catalítico de ácido glutámico (Glu) impide la catálisis (Fresco-Taboada et al, 2013a). En las figuras 9A y 9B se observan los centros activos de la 2'-desoxirribosiltransferasa II de *Lactobacillus leichmannii* (L/NDT) y de la 2'-desoxirribosiltransferasa I de *Lactobacillus helveticus* (LhPDT) respectivamente. El sitio de unión de la 2'-desoxirribosa se alinea con tres residuos ácidos, Asp<sup>92</sup>, Glu<sup>98</sup> y Asn<sup>123</sup> en L/NDT (Asp<sup>95</sup>, Glu<sup>101</sup>, Asn<sup>128</sup> en LhPDT), que forman un núcleo hidrofílico, común en los dos tipos de DRT. El O5' de la 2'-desoxirribosa forma puentes de hidrógeno con el carboxilo de la cadena lateral del Asp<sup>92</sup> y el grupo amino de la cadena lateral de la Asn<sup>123</sup>. El O3' interacciona con uno de los oxígenos del carboxilato del Glu<sup>98</sup>, mientras que el otro actúa como nucleófilo que ataca al C1' de la 2'-desoxirribosa en una catálisis general ácido-base. Cuando el donador es un ribonucleósido, el oxígeno nucleófilo del Glu catalítico forma un enlace de hidrógeno con el O2' de la ribosa y la enzima es inactiva (Fresco-Taboada et al, 2013a).



A)



B)



**Figura 9.** Estructura del centro activo de distintas NDTs. **A)** L/NDT (NDT tipo II) empleando 2'-desoxiuridina como sustrato. **B)** LhPDT (NDT tipo I) empleando 2'-desoxiuridina como sustrato (Fresco-Taboada et al, 2013a). La flecha indica el ataque nucleofílico del carboxilato del Glu catalítico al C1' de la 2'-desoxirribosa.

Además de este núcleo hidrofílico, existen una serie de residuos hidrofóbicos que están implicados en la correcta orientación y estabilización de la base. En las DRT de tipo II, la base se encuentra formando enlaces de hidrógeno con residuos polares y aromáticos, Gln<sup>46</sup>, Asp<sup>72</sup> y Tyr<sup>157</sup> en *LhNDT*; mientras que en DRT de tipo I algunas de estas interacciones no se pueden producir debido a la ausencia de la Gln, residuo localizado en un bucle que actúa como tapa del centro activo y que asegura el ajuste del sustrato en el mismo. En el caso de DRTs de tipo II, la presencia de la Gln fuerza a que ese bucle se cierre sobre el sitio activo y lo aisle del medio; mientras que en DRTs de tipo I, el bucle se encuentra en una conformación más abierta y sólo se produce ese ajuste cuando la base es voluminosa, una purina, ya que las pirimidinas tienen un tamaño menor.

Otra diferencia entre DRTs de tipo I y II es la región en la que se localiza la Tyr terminal. La posición de esta Tyr es más crítica en el caso de DRTs de tipo I, ya que es este residuo el que forma los enlaces de hidrógeno con la purina, mientras que en las de tipo II estos puentes los forma la Gln, ausente en las DRTs de tipo I. Esta hipótesis es consistente con el estudio de mutagénesis dirigida sobre *LhNDT* que muestra una pérdida importante de actividad cuando se trunca la Tyr terminal (Short et al, 1996).

#### 4. Análogos de nucleósidos

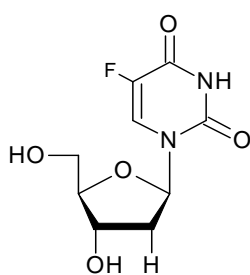
Los análogos de nucleósidos son compuestos modificados que son capaces de imitar a sus homólogos fisiológicos, por lo que pueden ser incorporados al DNA y RNA para inhibir la división celular y la replicación viral. Su acción tiene varios beneficios terapéuticos (Jordheim et al, 2013):

- Inhibición del crecimiento de las células cancerosas
- Inhibición de la replicación viral
- Inmunosupresión
- Inhibición de fosfodiesterasas
- Inhibición de polimerasas humanas y virales, quinasas o timidilato sintasa

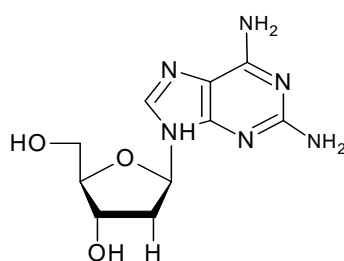
Desde la aprobación del primer análogo de nucleósido por la *Food and Drug Administration* (FDA) en 1969, la citarabina (citosina arabinósido), empleada en el tratamiento de la leucemia

mieloide aguda, se han sintetizado y evaluado muchos análogos para el tratamiento de diversos cánceres. En la actualidad existen 6 análogos de nucleósidos aprobados que se emplean como citotóxicos. En el caso de los análogos antivirales, el primero aprobado fue la edoxudina (5-etil-2'-desoxiuridina), también en 1969, y aunque ya no se emplea actualmente, hay 25 compuestos aprobados indicados para la hepatitis, VIH e infecciones por herpes virus (Figura 10). La mayor diferencia entre los análogos de nucleósidos anticancerígenos y los antivirales es la baja actividad de los segundos sobre las enzimas de mamíferos, lo que conlleva una mejor tolerancia y menor toxicidad que los antitumorales.

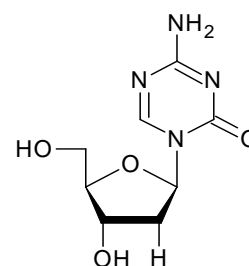
## ANTICANCERÍGENOS



5-Fluoro-2'-desoxiuridina

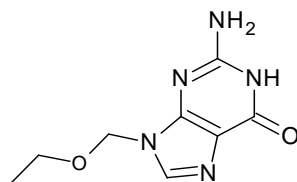


2,6-diaminopurina-2'-desoxirribosa

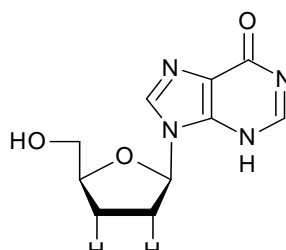


5-aza-2'-desoxicitidina

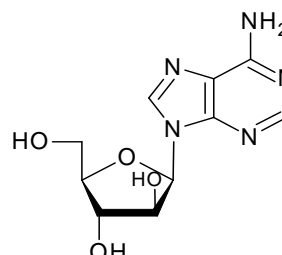
## ANTIVIRALES



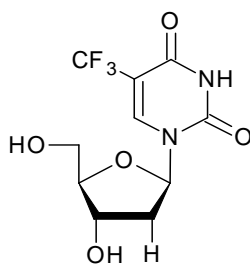
Aciclovir



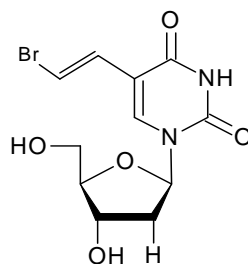
2',3'-dideoxiinosina



Adenina-arabinósido



5-Trifluorotimidina

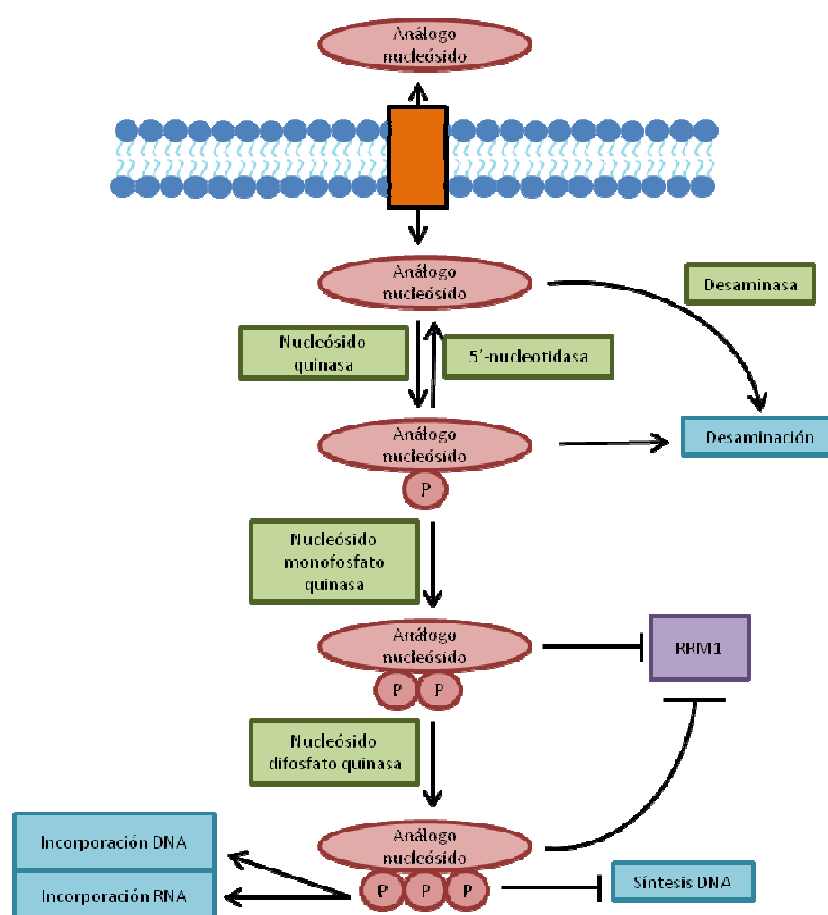


5-Bromovinil-2'-desoxiuridina

**Figura 10.** Ejemplos de análogos de nucleósidos.

#### 4.1. Mecanismo de acción de los análogos de nucleósidos

Los análogos de nucleósidos terapéuticos empleados en la actualidad siguen las mismas rutas metabólicas que los nucleósidos endógenos, actuando como antimetabolitos. Estos análogos entran en las células de mamífero a través de transportadores específicos de nucleósidos (Cano-Soldado et al, 2012), que pueden ser concentrativos (CNTs) o equilibrativos (ENTs). Los primeros permiten el transporte unidireccional de los nucleósidos en un proceso dependiente de sodio, mientras que los segundos facilitan la difusión y el transporte bidireccional de sus sustratos de forma independiente de sodio. Existen tres tipos de CNTs y cuatro de ENTs descritos en las membranas celulares de humanos, encontrándose ambos de forma ubicua (Molina-Arcas et al, 2009). Una vez dentro de la célula, los análogos son fosforilados en primer lugar por una nucleósido quinasa, después por una nucleósido monofosfato quinasa y por último por una nucleósido difosfato quinasa, creatina quinasa o 3-fosfoglicerato quinasa. Este proceso conlleva a la acumulación de análogos de nucleósido fosforilados en las células cancerosas o infectadas por virus (Figura 11).



**Figura 11.** Mecanismo de acción de los análogos de nucleósidos (Jordheim et al, 2013).

Los análogos trifosfato pueden competir con los nucleótidos endógenos y ser incorporados a los ácidos nucleicos o detener la síntesis nucleica al inhibir ciertas enzimas como las polimerasas. La ribonucleótido reductasa M1 (RRM1), enzima implicada en el metabolismo de nucleótidos, puede ser inhibida tanto por análogos di- como trifosfato. La incorporación de estos análogos en el DNA puede inducir la terminación de la elongación de la cadena nucleica, la acumulación de mutaciones en el genoma del virus (Broder, 2012; Leyssen et al, 2008) o la inducción de la apoptosis (Ewald et al, 2008).

Los análogos de nucleósidos se han sintetizado tradicionalmente mediante síntesis química (Boryski, 2008; Mikhailopulo, 2007; Mikhailopulo et al, 2011), implicando varios pasos de protección-desprotección de grupos y el empleo de agentes químicos y solventes orgánicos que son costosos y dañinos para el medio ambiente. La síntesis enzimática presenta ventajas sobre los métodos químicos ya que se incrementan la regio- y estereoespecificidad (García-Junceda et al, 2004), además de disminuir el tiempo de síntesis y ser una técnica respetuosa con el medio ambiente.

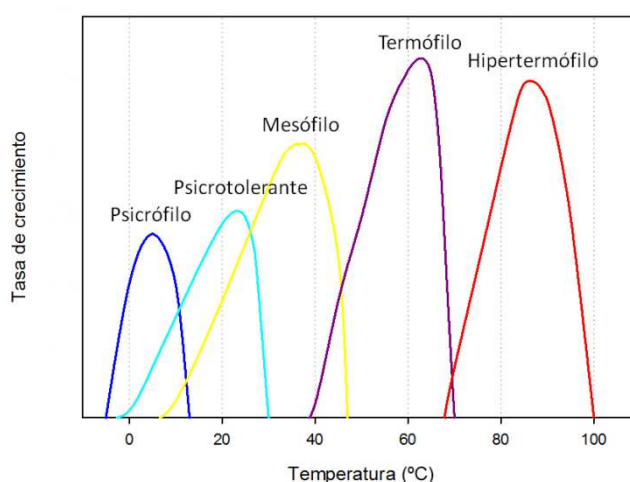
El uso de nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas en vez de nucleósido fosforilasas para la síntesis de nucleósidos y análogos de nucleósidos de interés terapéutico presenta varias ventajas. En las segundas, el equilibrio termodinámico para PNP, aunque no para PyNP, se encuentra desplazado hacia la síntesis del nucleósido, por lo que frecuentemente la reacción de transglicosilación consiste en la combinación de PyNP-PNP o UP-PNP para sintetizar nucleósidos púricos a partir de nucleósidos pirimidínicos como donadores y bases púricas como aceptores. Esto quiere decir que son necesarios dos pasos y el empleo de dos enzimas distintas para la síntesis del nucleósido de interés. Por el contrario, la reacción de transglicosilación empleando nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas se produce en un solo paso empleando una única enzima. Por otra parte, desde un punto de vista industrial, la inmovilización de enzimas es un requisito imprescindible para que el proceso sea rentable económicamente. En el caso de las NPs deben coinmovilizarse dos enzimas, lo que produce una disminución en la efectividad del proceso y la obtención de un biocatalizador heterogéneo; mientras que la inmovilización de una única DRT asegura la obtención de un biocatalizador homogéneo (Fresco-Taboada et al, 2013a).

Los microorganismos son la principal fuente de enzimas a nivel industrial. Tradicionalmente se han empleado los microorganismos mesófilos como productores de las mismas, con un creciente interés en los microorganismos psicrófilos en los últimos años.

## 5. Microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes

Gran parte de la superficie de la Tierra presenta temperaturas bajas. Los océanos, que constituyen más de la mitad de la superficie terrestre, tienen una temperatura media de 5 °C en superficie, mientras que en sus profundidades es de 1-3 °C. Estos medios, que muchas veces se encuentran congelados, no son estériles, sino que pueden albergar microorganismos en las zonas con agua líquida. Se ha detectado crecimiento microbiano y actividad metabólica por debajo de 3-6 m de hielo en lagos permanentemente helados, en hielo subglacial y en superficies nevadas del Polo Sur, donde la temperatura más alta en verano es de -10 °C aproximadamente (Hoyoux et al, 2004).

Un psicrófilo se define como un organismo con una temperatura óptima de crecimiento de 15 °C o menos, una máxima por debajo de 20 °C y una mínima de 0 °C o menos. Los organismos que pueden crecer a 0 °C pero tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 40 °C se denominan psicrotolerantes (Madigan et al, 2012). En la figura 12 se puede observar la clasificación de los microorganismos según su temperatura óptima de crecimiento.



**Figura 12.** Clasificación de los microorganismos según su temperatura óptima de crecimiento (Madigan et al, 2012).

Los psicrófilos se encuentran en ambientes permanentemente fríos y no sobreviven en ambientes templados, por encima de 20 °C. En 1948, Borg aisló y caracterizó el primer microorganismo psicrófilo, *Cytophaga psychrophila*, el cual presentaba una temperatura óptima de crecimiento entre 15 °C y 20 °C (Morita, 1975). Las comunidades microbianas psicrófilas contienen algas y bacterias que crecen en grandes masas en el hielo marino en las regiones polares y en zonas nevadas y glaciares, como el alga *Chlamydomonas nivalis*, la

bacteria *Polaromonas*, que crece entre 4 °C y 12 °C, o la bacteria *Psychromonas*, que crece a -12 °C, la temperatura de crecimiento bacteriano más baja conocida. Los organismos psicrófilos producen enzimas con estructuras con mayor flexibilidad que permiten catalizar las reacciones a temperaturas bajas y que pueden desnaturalizarse a temperaturas moderadas. Además, las enzimas psicrófilas suelen presentar varias de las siguientes características: disminución de la hidrofobicidad interna, aumento de la hidrofobicidad superficial, baja relación arginina/lisina, interacciones débiles entre dominios, disminución del contenido en estructura secundaria, mayor número de residuos de glicina, menor número de residuos de prolina en  $\alpha$ -hélice, menos sitios de unión a metales, menor número de puentes disulfuro, menos interacciones electrostáticas y oligomerización reducida (Cavicchioli et al, 2011).

Por otro lado, los microorganismos psicrotolerantes están más extensamente distribuidos en la naturaleza que los psicrófilos. Pueden ser aislados de tierra y agua de climas templados, así como de carne, leche y otros productos alimentarios que se mantienen refrigerados a 4 °C. La temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos psicrotolerantes se encuentra entre 20 °C y 40 °C y, aunque crecen a 0 °C, la mayoría no crecen bien a esta temperatura, pudiendo pasar varias semanas hasta que el crecimiento sea visible (Madigan et al, 2012).

Las enzimas “adaptadas al frío” presentan un gran valor biotecnológico ya que pueden ser más productivas que sus homólogas mesófilas y termófilas a bajas temperaturas al presentar mayor eficacia catalítica, además de su posible uso para transformar sustratos termolábiles que requieran ser tratados a temperaturas moderadas (Cavicchioli et al, 2011).

Hasta el momento, las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas descritas han sido aisladas de microorganismos mesófilos, con la excepción de la DRT tipo II de *Desulfotalea psychrophila* (Alfaro-Ureña, 2012). *D. psychrophila* es una proteobacteria Gram-negativa reductora de sulfato, aislada en el Ártico, que puede sobrevivir en aguas marinas a temperaturas bajas hasta -1,7 °C. Es un microorganismo anaerobio estricto cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 10 °C y 18 °C (Rabus et al, 2004).

### **5.1. *Bacillus psychrosaccharolyticus* (CECT 4074, ATCC 23296, DSM 6)**

*Bacillus psychrosaccharolyticus* fue definido como psicrófilo por Larkin y Stokes en 1967, y lleva este nombre por *psychros*: frío, *saccharon*: azúcar, y *lyticus*: capaz de digerir; es decir, es un *Bacillus* adaptado al frío y fermentador de azúcar.

Es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, en forma de bastón de entre 1,0 y 3,0  $\mu\text{m}$  y mótil debido a sus abundantes flagelos. Se encuentra en tierra y pantanos subterráneos.

Forma esporas elipsoidales, centrales o paracentrales, llenando la mayoría del esporangio. Es capaz de crecer entre 0-3 °C y 30-35 °C, aunque no se ha determinado su temperatura óptima, y puede esporular y germinar a 0 °C (Larkin et al, 1967).

Seo y colaboradores llevaron a cabo un estudio proteómico sobre *B. psychrosaccharolyticus* para conocer sus mecanismos de adaptación al frío (Seo et al, 2004). A través de mapas proteómicos en dos dimensiones a distintas temperaturas de crecimiento se observó que a bajas temperaturas las proteínas glicolíticas son las más abundantes, compensándose la baja capacidad de estas en frío con un aumento en la expresión. Además, las segundas proteínas más abundantes fueron las de respuesta a estrés, a pesar de que un ambiente frío no debería ser condición adversa para este microorganismo. En general, las proteínas inducidas por frío en *B. psychrosaccharolyticus* fueron similares a las expresadas en las mismas condiciones por *B. subtilis*, aquellas implicadas en fisiología celular (quimiotaxis, plegamiento proteico y metabolismo general). Este resultado indica que la condición de psicrotolerante de *B. psychrosaccharolyticus* debe estar relacionada con la respuesta de sus proteínas a una bajada de temperaturas, mientras que la mayoría de extremófilos tienen proteínas que sólo son estables en las condiciones extremas, viéndose afectada su viabilidad fuera de ellas.

Por otra parte, *Bacillus psychrosaccharolyticus* es un microorganismo modelo en la respuesta a estrés por solventes debido a la presencia de una chaperona, Hsp33, que permite al microorganismo ser más tolerante a los mismos, así como a estrés oxidativo o choque térmico, lo que supone una ventaja a la hora de emplear este microorganismo en el campo industrial, al disminuir el coste y aumentar la eficacia (Kang et al, 2007). Asimismo, se han estudiado otras dos enzimas de *B. psychrosaccharolyticus*, la lactato deshidrogenasa (Nandakumar et al, 1999) y la alanina racemasa. Esta última es una enzima homodimérica dependiente de piridoxal 5'-fosfato (PLP) clasificada como enzima psicrófila ya que puede llevar a cabo la reacción a 0 °C, aunque presenta actividad máxima a 35 °C en ausencia de PLP y a 60 °C en presencia de dicho cofactor (Okubo et al, 1999).

*B. psychrosaccharolyticus* es el único microorganismo psicrotolerante en el que se ha descrito actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa (Fernández-Lucas et al, 2007).

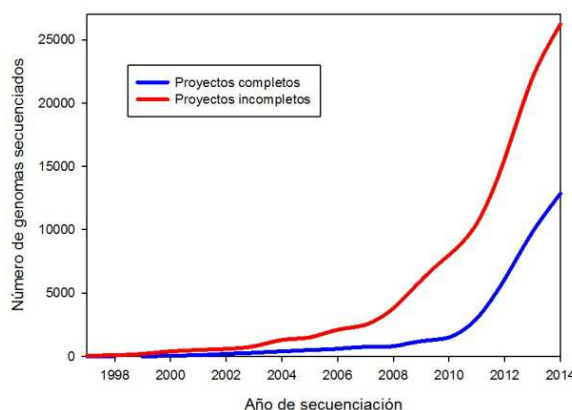


## 5.2. Genomas de microorganismos psicrófilos

El genoma de un organismo se define como el conjunto de los genes contenidos en el DNA de su cromosoma(s). El genoma bacteriano normalmente se encuentra en una molécula de DNA circular superenrollada, aunque también se puede encontrar en forma de dos o más cromosomas, en forma lineal o en moléculas de DNA extra, denominadas plásmidos.

La secuenciación de DNA comenzó en los años 70 cuando Sanger y colaboradores secuenciaron el virus Lambda (50.000 nucleótidos) (Sanger et al, 1977). En esta época se comenzaron a secuenciar los genomas de virus y orgánulos, pero la secuenciación de un genoma bacteriano completo no era posible debido a las limitaciones técnicas y económicas. Más tarde, las mejoras en las técnicas de secuenciación facilitaron la obtención del primer genoma bacteriano, el de *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al, 1995). A partir de 2005 nacieron las tecnologías de secuenciación de DNA de siguiente generación, desarrollándose distintas técnicas que siguen hoy en día en evolución (Duan et al, 2010).

En febrero de 2014 el número total de proyectos de secuenciación genómica rondaba los 40.000, de los cuales alrededor de 13.000 se encontraban finalizados, ya fuese como genoma completo o como borrador o “draft” (Genomes Online Database, genomesonline.org) (Figura 13).



**Figura 13.** Número de proyectos de secuenciación de genomas entre 1997 y 2014. - Proyectos finalizados, - proyectos sin concluir.

Existen diversas aplicaciones de la secuenciación de genomas bacterianos:

- Identificación de genes de virulencia, que pueden proporcionar conocimiento sobre la patogenicidad bacteriana. Los genes de virulencia se encuentran en regiones específicas de los

cromosomas bacterianos, formando *islas de patogenicidad* (PAIs). Estas regiones tienen hasta 200 Kb de tamaño y suelen presentar secuencias específicas de inserción en sus extremos que facilitan su translocación e inserción entre microorganismos (Donkor, 2013).

- Predicción de resistencia a antibióticos: identificación de elementos genéticos conocidos e implicados en esa resistencia. Las pruebas convencionales de susceptibilidad a un antibiótico son poco costosas, rápidas, y permiten la detección de resistencias no asociadas a mutaciones génicas sino a un cambio en la permeabilidad de las paredes celulares (Bertelli et al, 2013), por lo que la secuenciación es más importante en el descubrimiento de nuevas dianas para el desarrollo de nuevos antibióticos con mecanismos de acción distintos a los ya conocidos.

- Diagnóstico bacteriológico: detección de patógenos en muestras clínicas a través de la secuenciación directa de dichas muestras. Esta estrategia ha sido aplicada con éxito en la secuenciación de *Plasmodium falciparum* a partir de una muestra sanguínea (Auburn et al, 2011).

- Vacunología reversa: detección a partir de la secuencia del genoma de proteínas putativas expuestas en la superficie y por tanto accesibles a los anticuerpos. Una vez identificadas se caracteriza su antigenicidad y accesibilidad en la superficie celular. Gracias a esta estrategia, en diciembre de 2013 concluyó la fase clínica III de una vacuna contra *Neisseria meningitidis* grupo B (ClinicalTrials.gov: NCT01214850), que ya ha sido aprobada en Europa.

Los primeros organismos psicrófilos cuyo genoma fue secuenciado son las *archaea* *Methanogenium frigidum* y *Methanococcoides burtonii* (Saunders et al, 2003). En la última década, con la mejora de las técnicas de secuenciación, se han secuenciado numerosas bacterias psicrófilas, desde *Desulfotalea psychrophila* en 2004 hasta *Polaromonas glacialis* en 2014 (Duchaud et al, 2007; Medigue et al, 2005; Pandiyan et al, 2013; Rabus et al, 2004; Yin et al, 2013; Zhiyong et al, 2014).

El análisis de los datos genómicos de microorganismos psicrófilos ha revelado que existen diversos mecanismos de adaptación al frío, como el sesgo hacia un determinado tipo de aminoácidos, cambios en la fluidez de la membrana, el aumento de transportadores de membrana específicos para ciertos solutos, la inducción de sistemas de respuesta al frío o la plasticidad genómica (Casanueva et al, 2010).

## 6. Inmovilización de enzimas

Hoy en día se producen gran variedad de enzimas a precios aceptables, pero, debido a su baja estabilidad, al alto coste de purificación y a la imposibilidad de reciclarlas, su aplicación industrial sólo es rentable si se inmovilizan (Sheldon, 2007). La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y pueden ser reutilizadas repetidamente (Taylor, 1991). El primer uso industrial de enzimas inmovilizadas data de 1967, cuando Chibata y colaboradores desarrollaron la inmovilización de la aminoacilasa de *Aspergillus oryzae* para la resolución de aminoácidos racémicos D-L sintéticos (Tosa et al, 1966). Además de su posible aplicación industrial, las técnicas de inmovilización pueden ser empleadas para la creación de un gran número de productos biotecnológicos útiles en diagnóstico, cromatografía de bioafinidad y biosensores (Guibault et al, 1991).

En principio, una enzima inmovilizada requiere la presencia de una matriz no catalítica que esté diseñada para facilitar la separación y aumentar la estabilidad del biocatalizador (Cao, 2005). La actividad final del complejo estará determinada por la interacción entre el componente inactivo, la matriz, y el activo, la enzima (Sheldon, 2007).

### 6.1. Clasificación de los soportes

Las características de la matriz son de vital importancia en el comportamiento de la enzima inmovilizada. El soporte ideal debe presentar resistencia física a la compresión y al ataque microbiano, ser hidrofílico, inerte para la enzima, biocompatible y de bajo coste. En particular, el diámetro de poro y el tamaño de partícula determinan el área total de superficie, y por tanto afectan a la capacidad de unión de la enzima. Los soportes no porosos presentan pocas limitaciones difusionales pero tienen baja capacidad de carga; mientras que los porosos tienen una superficie mayor, lo que permite mayor carga enzimática y la protección de la enzima frente al medio (Brena et al, 2006).

Los soportes se pueden clasificar en orgánicos e inorgánicos (Tabla 1).

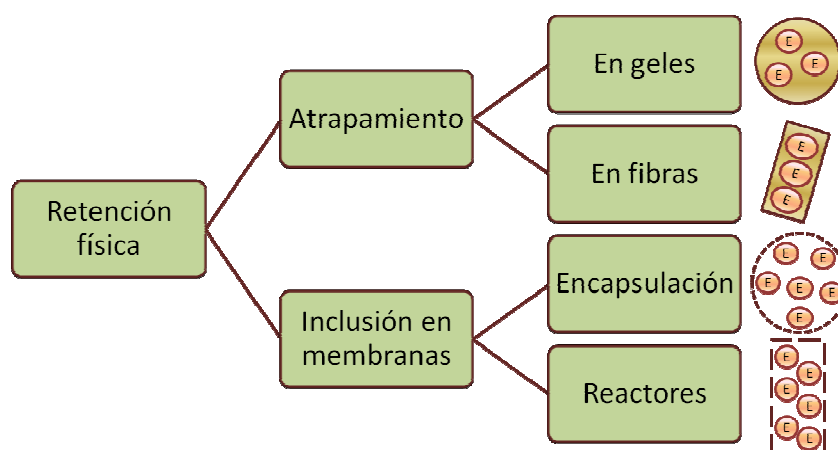
**Tabla 1.** Clasificación de los soportes (Brena et al, 2006)

Orgánicos
<i>Polímeros naturales</i>
-Polisacáridos: celulosa, dextrano, agarosa, quitosano, alginato
-Proteínas: colágeno, albúmina
<i>Polímeros sintéticos</i>
-Poliestireno
-Otros: polimetacrilato, poliacrilamida, poliamida, polivinilo
Inorgánicos
<i>Minerales naturales:</i> bentonita, sílica
<i>Materiales procesados:</i> vidrio, metal, óxidos de metales

Las enzimas se pueden unir al soporte a través de interacciones reversibles (adsorción física, unión iónica) o irreversibles (enlace covalente). Otro modo de clasificar los métodos de inmovilización es según el tipo de unión: retención física o unión química.

## 6.2. Inmovilización de enzimas por retención física

Este método se divide en atrapamiento en geles o fibras y en inclusión en membranas (Figura 14).



**Figura 14.** Métodos de inmovilización de enzimas mediante retención física.

### 6.2.1. Atrapamiento

Se basa en la oclusión de la enzima en una red polimérica (alginato, poliacrilamida, poliuretano) que permite el paso de sustrato y producto a través de ella pero no de la enzima (O'Driscoll, 1976). El proceso conlleva la adición de la enzima a una solución de monómero y la posterior polimerización del mismo. Este tipo de inmovilización puede llevarse a cabo en geles o en fibras, siendo más resistentes las segundas.

La principal ventaja de este método es que se necesita poca cantidad de enzima para obtener derivados activos, y además esta no sufre ninguna alteración en su estructura. Deben controlarse las condiciones de polimerización y comprobar que la naturaleza química del proceso no altera los grupos catalíticos de la enzima (Arroyo, 2001).

Se han inmovilizado distintas enzimas mediante atrapamiento, como por ejemplo lipasas de *Pseudomonas aeruginosa* en una matriz de sílica mediante el método sol-gel (Reetz et al, 1998), empleadas en la resolución de muestras racémicas y en la hidrólisis de triglicéridos.

### 6.2.2. Inclusión en membranas

Las enzimas se encuentran rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto pero no de enzima. Dentro de esta categoría se pueden distinguir la microencapsulación y los reactores de membrana.

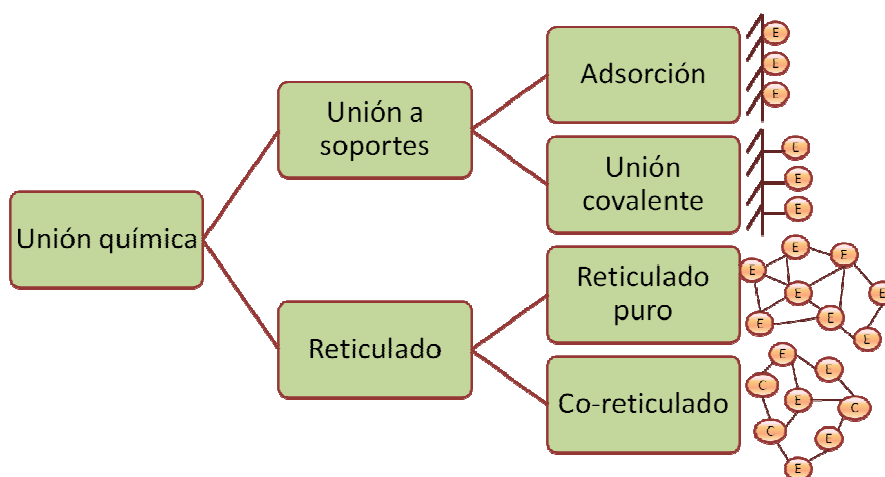
En la microencapsulación, al igual que en el atrapamiento, la enzima se encuentra protegida del medio externo pero su aplicación es limitada, ya que si se utilizan grandes cantidades de sustratos se produce una limitación en la transferencia de los mismos (Lalonde et al, 2002).

Esta técnica se ha utilizado para encapsular la lacasa de *Trametes versicolor* en microcápsulas preparadas mediante reticulación interfacial de polietilenimina (PEI) empleando cloruro de sebacoilo como agente entrecruzante (Kouisni et al, 2009). A continuación, las microcápsulas se pueden inmovilizar sobre papel para formar papel bioactivo, papel que puede detectar y oxidar compuestos orgánicos como fenoles tóxicos.

Los reactores de membrana emplean membranas impermeables a la enzima y permeables al producto final. Se establece un flujo líquido de sustrato que entra en el reactor, donde sucede la reacción, y el producto formado sale a través de la membrana. Este método debe emplearse con sustratos de alto peso molecular, solubles en agua y en altas concentraciones, ya que puede producirse la adsorción de éstos a la membrana.

### 6.3. Inmovilización de enzimas por unión química

Existen dos tipos de inmovilización mediante unión química: unión a soportes y reticulado (Figura 15).



**Figura 15.** Métodos de inmovilización de enzimas mediante unión química.

#### 6.3.1. Unión a soportes

La unión a soportes se puede dividir en unión no covalente y unión covalente.

En la unión no covalente, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante adsorción (fuerzas Van der Waals, enlaces de hidrógeno), interacción hidrofóbica, interacción iónica o unión a metales. En todos los casos se produce la inmovilización no covalente, por lo que el proceso es reversible si se cambian las condiciones que influyen en la fuerza de la interacción (pH del medio, fuerza iónica, temperatura, permeabilidad y área superficial del soporte o polaridad del solvente).

Entre las ventajas de este método se encuentran la sencilla preparación del biocatalizador, el bajo coste y la preservación de la actividad catalítica de la enzima. Por otro lado, pueden aparecer problemas derivados de la débil unión entre la enzima y el soporte, por lo que deben optimizarse rigurosamente las variables que controlan la adsorción.

Como ejemplo, Cabrera-Padilla y colaboradores (Cabrera-Padilla et al, 2012) inmovilizaron la lipasa de *Candida rugosa* mediante adsorción en poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) biodegradable, obteniendo una actividad residual del 94 % después de 4 h a 50 °C y

manteniendo la actividad después de 12 ciclos. Estas lipasas inmovilizadas pueden emplearse en la fermentación de yogurt y queso, así como en la degradación de lípidos.

La inmovilización de proteínas mediante unión covalente es la más utilizada, siendo su principal ventaja la estabilidad de los enlaces formados, que impiden la liberación de la enzima al medio.

La unión covalente es irreversible, el biocatalizador no puede ser liberado sin destruir la actividad biológica de la enzima o el soporte. Para que se produzca la unión, los grupos químicos del soporte deben ser activados para generar grupos electrófilos y que éstos reaccionen con los nucleófilos de las enzimas (las cadenas laterales de aminoácidos como la lisina, cisteína, tirosina o histidina y, en menor medida, de la metionina, triptófano, arginina y ácido aspártico). El resto de aminoácidos, por su carácter hidrofóbico, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, por lo que no pueden intervenir en la unión covalente. Las reacciones covalentes más empleadas dan lugar a enzimas unidas al soporte a través de grupos amida, éter, tioéter o carbamato.

Para llevar a cabo una correcta inmovilización covalente debe conocerse la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condicionará el rendimiento de la inmovilización; así como la estabilidad de la enzima unida al soporte. Para mantener las propiedades estructurales y funcionales de las enzimas durante el proceso, se puede añadir un agente entrecruzante. El más empleado es el glutaraldehído, que es soluble en medio acuoso y puede formar enlaces covalentes estables entre distintas subunidades (Datta et al, 2013).

Recientemente, la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa de *Bacillus licheniformis* ha sido inmovilizada de forma covalente sobre nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos aldehído, permitiendo su empleo en la síntesis de derivados  $\gamma$ -glutamil, compuestos con gran potencial desde el punto de vista farmacéutico por ser antagonistas de la excitación del sistema nervioso, antiepilépticos, e incluso potenciadores del sabor) (Chen et al, 2013).

### 6.3.2. Reticulado

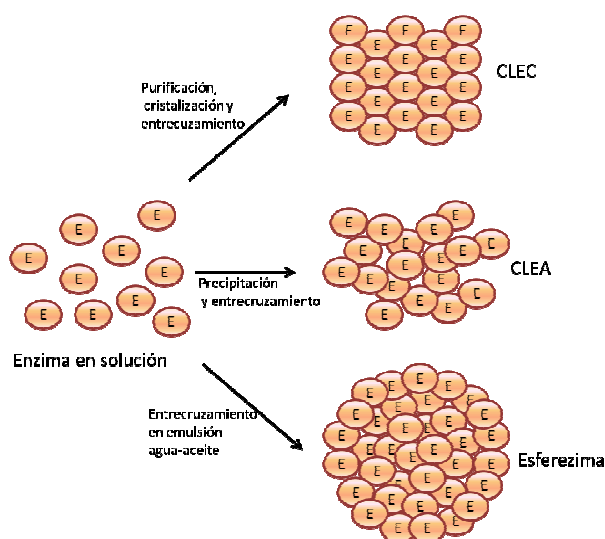
El uso de soportes sólidos para inmovilización puede reducir la actividad específica y volumétrica del biocatalizador ya que el soporte puede suponer un 90-99 % del volumen total (Sheldon, 2007). La inmovilización de enzimas sin necesidad de soporte se basa en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Los reactivos más empleados son dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos o sales de bisdiazonio.

El co-reticulado consiste en el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, albúmina de suero bovino), para facilitar el reticulado con un agente bifuncional.

Se pueden producir biocatalizadores más fuertes físicamente mediante entrecruzamiento cuando las enzimas están próximas entre sí, por ejemplo en forma de cristal. Los *Cross-linked Enzyme Crystals* (CLECs) se forman mediante la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (St Clair et al, 1992). Como los cristales contienen una única enzima, este método garantiza que no haya contaminantes (Figura 16).

La desventaja de esta técnica es el requerimiento de proteína totalmente pura y que permita ser cristalizada. Por ello, un método menos costoso es la precipitación de proteínas y posterior entrecruzamiento de los agregados formados, dando lugar a los CLEAs (*Cross-linked Enzyme Aggregates*) (Cao et al, 2001). Un ejemplo es la inmovilización de la PHB despolimerasa de *Streptomyces exfoliatus* en CLEAs para la degradación de polihidroxibutirato (Hormigo et al, 2012).

Otro modo de inmovilización mediante reticulado es el desarrollado por Moolman, que consiste en la formación de una emulsión de lipasa y surfactante en aceite mineral; la adición de un agente entrecruzante bifuncional y la consecuente generación de partículas esféricas portadoras de enzima, denominadas esferezimas (Moolman et al, 2005). En este proceso la lipasa migra a la interfase y dispone el centro activo hacia la fase oleosa. De esta forma, la enzima queda entrecruzada para formar partículas esféricas permanentes, y el solvente puede ser eliminado.



**Figura 16.** Comparación de los métodos de inmovilización por reticulado (Brady et al, 2009).



## **6.4. Efectos de la inmovilización**

La inmovilización puede alterar el comportamiento de las enzimas, tanto su estabilidad como su actividad.

### **6.4.1. Efectos en la estabilidad del derivado inmovilizado**

En general se produce un incremento en la estabilidad de la enzima que se inmoviliza, debido a cuatro factores principalmente, la estabilización conformacional de la proteína al unirse al soporte, la protección frente a proteasas, la anulación de la agregación intermolecular y la alteración del microentorno (Klibanov, 1983).

### **6.4.2. Efectos en la actividad enzimática**

En términos generales, la actividad de la enzima después de la inmovilización se ve afectada negativamente, llegando en algunos casos a desaparecer. Las principales razones para esta pérdida de actividad son:

#### **a) Efectos difusionales**

La difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede verse afectada por resistencias difusionales externas (cuando el soporte es insoluble en el medio, el sustrato debe atravesar la capa de Nernst que rodea el soporte) o internas (el sustrato debe atravesar el interior del gel, fibra o poro del soporte).

#### **b) Efectos electrostáticos entre sustrato y soporte**

Si el sustrato y el soporte tienen la misma carga se producirá repulsión entre ellos, mientras que si tienen cargas distintas habrá atracción. En el primer caso la  $K_m$  aparente podrá verse reducida, mientras que en el segundo se verá aumentada.

#### **c) Efectos estéricos**

Cuando el sustrato es de alto peso molecular puede producirse una pérdida apreciable de actividad, debido a que el soporte impide el paso del sustrato al centro activo de la enzima. Este problema puede solucionarse a través de un brazo espaciador más largo entre la enzima y el soporte (Guisán et al, 1997).

#### d) Efectos del microentorno

La actividad de la enzima se ve influenciada por el entorno en el que se encuentra, dependiente del tipo de soporte al que se haya unido la proteína. Los parámetros relativos al soporte que intervienen en la actividad final del biocatalizador son: i) la hidrofobicidad/hidrofiliidad de la superficie de la matriz, ii) la curvatura del soporte, y iii) la distribución espacial de las moléculas de la enzima sobre/en el soporte (Gao et al, 2012).

### **6.5. Inmovilización en soportes recubiertos con polímeros iónicos**

La estabilización de enzimas multiméricas es el principal problema a la hora de su implementación a nivel industrial. Mientras que el primer paso en la desactivación de la mayoría de enzimas monoméricas implica un cambio en su estructura terciaria (Ahern et al, 1985), en las multiméricas se produce la disociación de las subunidades de la enzima o la pérdida de su estructura cuaternaria (Pilipenko et al, 2007). Existen distintas formas de estabilizar las enzimas multiméricas: mediante ingeniería del medio (pH, presión, adición de cationes o aditivos), ingeniería proteica (generación de nuevos puentes disulfuro), entrecruzamiento físico con polímeros iónicos, entrecruzamiento químico o inmovilización de dichas enzimas (Fernández-Lafuente et al, 2009).

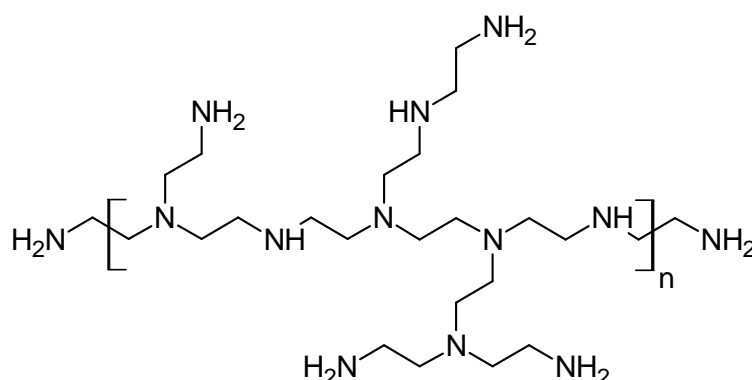
En la mayoría de las aplicaciones industriales, las enzimas deben estar inmovilizadas para poder ser reutilizadas y facilitar el diseño del reactor. Como se ha comentado en el apartado anterior, existen diversas técnicas de inmovilización, que se pueden aplicar tanto a enzimas monoméricas como multiméricas.

Los soportes que permiten la adsorción iónica de enzimas monoméricas son aptos para la inmovilización reversible de enzimas multiméricas, siendo los soportes porosos recubiertos con polímeros flexibles que presentan alta concentración de iones mucho más apropiados que las resinas de intercambio iónico (Mateo et al, 2000).

Los soportes activados con distintos grupos (glioxil, amino, epoxi) pueden ser recubiertos covalentemente con diferentes polímeros iónicos como polietilenimina, polialilamina y dextrano aldehídico. Los soportes que presentan grupos iónicos (carboximetil, sulfónico, amino) también pueden ser recubiertos con polímeros de la carga opuesta (dextrano-sulfato) (Fuentes et al, 2004a; Fuentes et al, 2004b).

La polietilenimina (PEI) es un polímero formado por una unidad repetida compuesta por un grupo amino y dos carbonos alifáticos. Las polietileniminas lineales contienen únicamente

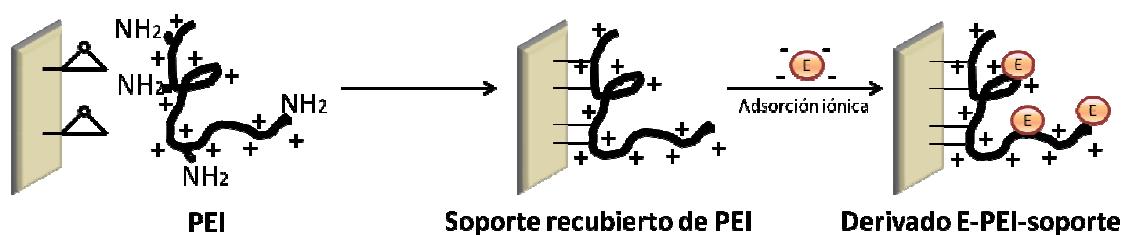
aminas secundarias, mientras que las ramificadas contienen aminas primarias, secundarias y terciarias (Figura 17). Este compuesto tiene numerosos usos, encontrándose presente en detergentes, tintes o cosméticos.



**Figura 17.** Polietilenimina ramificada.

La polietilenimina ramificada puede tener diversos pesos moleculares. Respecto a su aplicación en inmovilización, a medida que aumenta el tamaño del polímero y la cantidad de este que recubre el soporte, aumenta la fuerza de la inmovilización y por tanto disminuye la probabilidad de desorción de la enzima (Mateo et al, 2000).

Para optimizar la adsorción iónica de la enzima, el soporte se derivatiza con polietilenimina, quedando la superficie de este recubierta con un polímero catiónico flexible que interacciona iónicamente con la proteína (Figura 18).

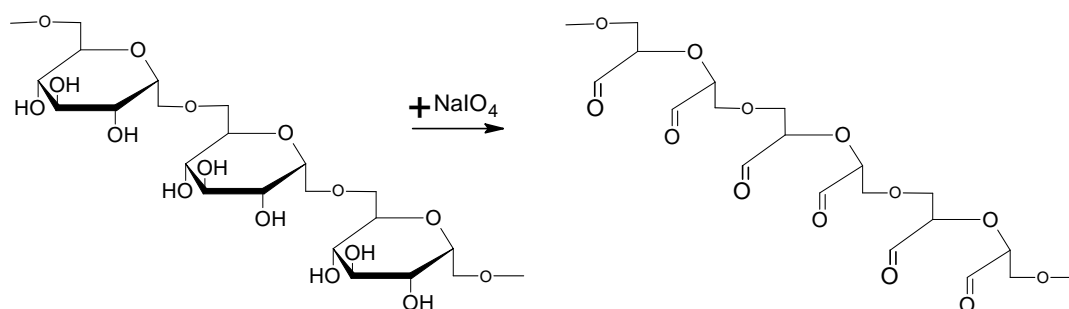


**Figura 18.** Proceso de adsorción de la enzima a un soporte recubierto con PEI (Mateo et al, 2006c).

## 6.6. Técnicas de post-inmovilización. Entrecruzamiento con dextrano aldehídico

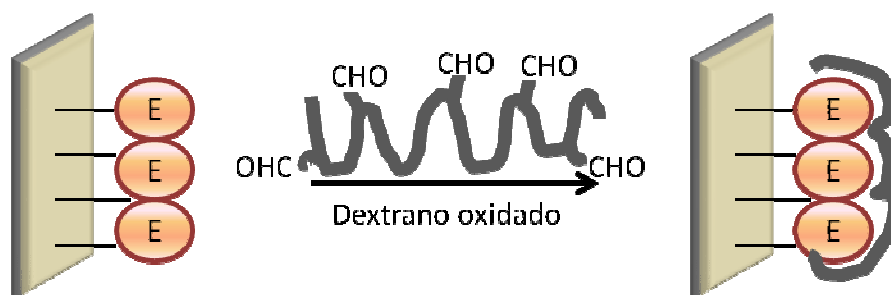
A menudo la inmovilización de proteínas por adsorción no es suficiente para estabilizar la estructura cuaternaria de las enzimas multiméricas, ya que las subunidades pueden encontrarse en planos diversos. En estos casos la enzima puede liberar subunidades al medio de reacción y por tanto desactivarse fácilmente (Mateo et al, 2006b).

Para prevenir esta desactivación, una estrategia eficaz es el entrecruzamiento de las subunidades de la enzima inmovilizada empleando polímeros multifuncionales, como el dextrano polialdehídico. El dextrano es un polímero de glucosa con ramificaciones compuesto por cadenas de distintas longitudes (3-2000 kDa). La cadena lineal está formada por moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,6 glucosídicos, mientras que las ramificaciones comienzan a través de enlaces  $\alpha$ -1,3 (Bickerstaff, 1997). Cada monómero de glucosa contiene dos puntos que pueden ser oxidados fácilmente por periodato para dar lugar a dos grupos aldehído por molécula de glucosa (Fernández-Lafuente et al, 1999) (Figura 19).



**Figura 19.** Proceso de oxidación del dextrano.

Los grupos aldehído del dextrano reaccionan con las aminas primarias de la superficie de la enzima, formándose grupos imino, y la posterior reducción con borohidruro sódico da lugar a enlaces amino secundarios entre la proteína y el polímero, además de reducir los grupos aldehído libres del dextrano (Figura 20).



**Figura 20.** Entrecruzamiento de la enzima unida a soporte con dextrano aldehídico (Fernández-Lafuente, 2009).

El dextrano puede ser muy útil en el entrecruzamiento entre subunidades por dos razones:

- i) Presenta un gran número de grupos reactivos que pueden reaccionar con aminas primarias de la superficie proteica.
- ii) Su gran tamaño permite que esté implicado en el entrecruzamiento de grupos localizados en distintas subunidades proteicas.

Esta estrategia de post-inmovilización se ha empleado con éxito en el caso de la  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus* sp. T2 (Pessela et al, 2004) así como de diversas nucleósido fosforilasas, como la uridina fosforilasa de *Bacillus subtilis* (Rocchietti et al, 2004) o la timidina fosforilasa de *Escherichia coli* (Serra, et al 2011).

## **II. OBJETIVOS**



Como ya se ha comentado en la introducción, los análogos de nucleósidos son compuestos muy interesantes desde el punto de vista terapéutico, empleándose varios de ellos en el tratamiento de enfermedades víricas y en tratamientos antitumorales. La síntesis química de estos análogos requiere múltiples pasos, lo que supone procesos costosos y no respetuosos con el medio ambiente. La síntesis enzimática constituye una alternativa eficaz para simplificar el proceso de producción y reducir el coste del proceso. Las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas descritas hasta el momento han sido aisladas de microorganismos mesófilos, con excepción de la NDT de la bacteria psicrófila *Desulfotalea psychrophila*. Los microorganismos psicrófilos presentan ventajas respecto a los mesófilos por presentar enzimas con mayor flexibilidad. Como se ha descrito en la introducción, *Bacillus psychrosaccharolyticus* es el único microorganismo psicrotolerante en el que se ha descrito actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa. Por todo ello, el propósito de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa del microorganismo psicrotolerante *B. psychrosaccharolyticus*, condición que podría suponer una ventaja a la hora de su implementación industrial por la posibilidad de trabajar a menor temperatura, estableciendo los siguientes objetivos:

1. Identificación, clonación y expresión del gen que codifica la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 (*BpNDT*).
2. Producción y purificación de *BpNDT*. Determinación del tipo de nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa.
3. Caracterización bioquímica de *BpNDT*: efecto de la temperatura, pH, fuerza iónica y cationes sobre la actividad y estabilidad de la enzima. Termoestabilidad.
4. Especificidad de sustrato: síntesis de nucleósidos naturales y no naturales. Determinación del mecanismo cinético.
5. Caracterización estructural de *BpNDT*: Determinación de la estructura terciaria y cuaternaria, estado de oligomerización y masa molecular.
6. Determinación del mecanismo químico: identificación de los residuos del centro activo mediante mutagénesis dirigida.
7. Inmovilización de *BpNDT* y empleo del derivado inmovilizado en la síntesis de nucleósidos con actividad terapéutica.





# **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Reactivos

Los nucleósidos y bases empleados en este trabajo fueron adquiridos en varias casas comerciales. La adenina (Ade), timina (Thy), 2'-desoxicitidina (dCyd), citosina (Cyt), hipoxantina (Hyp), timidina (Thd), 2,6-diaminopurina (2,6-DAP), 5-metilcitosina (5-MeCyt), 2'-desoxiinosina (dIno), benzimidazol (B), 5-etiluracilo (5-EtUra), 2-fluoroadenina (2-FAde), 5-bromouracilo (5-BrUra), 6-metiluracilo (6-MeUra) y 6-propil-2-tiouracilo (6-PTUra) en Sigma (Estados Unidos); 5-azacitosina (5-azaCyt), 5-trifluorotimina (5-TFThy), 2'-desoxiguanosina (dGua), N-benziladenina (N-BAde), 7-deaza-6-hidroxipurina (7-DHP), 5-azauracilo (5-azaUra), 2'-O-metil-5-metilcitidina (O-dMeCyd) y 2'-fluoro-arabinosil-uracilo (2'-FaraUra) en Carbosynth Ltd (Reino Unido); 2'-desoxiuridina (dUrd), 2'-desoxiadenosina (dAdo), arabinosil-adenina (*araA*) y arabinosil-uracilo (*araU*) en Pro. Bio. Sint. S.p.A (Italia); 5-fluoro-2-metoxi-4(1H)pirimidinona (5-FMP), uracilo (Ura), 5-(hidroximetil)uracilo (5-HMeUra), 6-mercaptopurina (6-M), 5-clorouracilo (5-ClUra), 5-fluorocitosina (5-FCyt), 5-yodouracilo (5-IUra) y 4-hidroxi-2-mercapto-6-metilpirimidina (4-HMMeP) en Aldrich (Estados Unidos); teofilina (Teo) en Fluka (Suiza) y 5-fluorouracilo (5-Fura) en Fagron (Países Bajos).

Los reactivos empleados para la preparación de medios de cultivo fueron agar y bacto triptona de Becton Dickinson (Estados Unidos); extracto de carne, fosfato sódico y glucosa de Fluka; peptona de soja y extracto de levadura de Conda-Pronadisa (España); hidrolizado de caseína de Difco (Estados Unidos); cloruro sódico, sulfato magnésico y D/L-triptófano de Sigma-Aldrich y cloruro amónico, cloruro cálcico, citrato de sodio y L-metionina de Merck (Alemania). Los antibióticos ampicilina, cloranfenicol, gentamicina y kanamicina se compraron en Sigma-Aldrich y las placas Petri en Thermo-Scientific (Estados Unidos).

Los reactivos utilizados para PCR, tales como *Pfu* DNA polimerasa, desoxinucleótidos o cloruro magnésico se adquirieron en Thermo Scientific, mientras que los oligonucleótidos se sintetizaron en Sigma. La DNA ligasa del bacteriófago T4 en Roche (Alemania) y las enzimas de restricción en New England Biolabs (Estados Unidos). El isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) se adquirió de Sigma.

Los productos empleados para la electroforesis de proteínas y transferencia a membrana como la acrilamida, bis-acrilamida, 2-propanol y azul brillante de Coomassie G250 se adquirieron en Fluka; el azul de bromofenol, tetrametiletilendiamina (TEMED), dodecil sulfato sódico (SDS), 2-mercaptoetanol, tioglicolato y ácido acético en Sigma-Aldrich; el persulfato amónico y los marcadores de masa molecular *Broad Range* en Bio-Rad (Estados Unidos); la

glicina en Santa Cruz Biotechnology (Estados Unidos) y la membrana de PVDF *Immobilon P* en Millipore (Estados Unidos). En cuanto a la electroforesis de ácidos nucleicos, la agarosa se compró en Conda-Pronadisa; el gel red en Biotium (Estados Unidos); el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en Fluka y el marcador  $\lambda$ DNA/ *Eco91I*(*BstEII*) en Fermentas (Alemania).

El reactivo de Bradford empleado, reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay*, para cuantificación de proteínas fue de Bio-Rad. El polietilenglicol (PEG) 35000 Da, fosfato potásico monobásico y dibásico, Trizma base y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) en Sigma-Aldrich; la membrana de diálisis de diámetro de poro 6-8000 Da en SpectrumLabs (Estados Unidos) y el hidróxido sódico en Merck.

Los compuestos utilizados para determinar el efecto de cationes sobre la actividad de la enzima como el sulfato potásico, sulfato de aluminio, sulfato de magnesio, sulfato de cobre (II), cloruro magnésico, cloruro de manganeso, cloruro de rubidio, cloruro de cobalto, cloruro de hierro (III) y cloruro de litio se compraron en Sigma; el sulfato amónico en Scharlau (España); mientras que el sulfato sódico, sulfato de zinc, cloruro potásico, cloruro de calcio y cloruro de bario en Merck.

Los disolventes etanol absoluto, acetona, fenol y dimetilformamida fueron adquiridos en Scharlau. El glicerol, ácido clorhídrico y dimetilsulfóxido en Sigma.

El metanol y acetonitrilo empleados como fase móvil para HPLC se compraron en Scharlau, el acetato de trimetilamonio en Fluka.

La lisozima y albúmina de suero bovino (BSA) se adquirieron en Sigma.

Entre los reactivos empleados para inmovilización, la agarosa reticulada al 6 % (Sefarosa CL-6B) se adquirió en Amersham Biosciences (Estados Unidos), la polietilenimina ramificada (PEI) (600 Da) y el dextrano (20-100 kDa) en Sigma-Aldrich. Los epoxi-Sepabeads (EC-EP) fueron donados por Resindion (Italia).

## 2. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo se detallan en la tabla 2 con sus genotipos más relevantes. Los plásmidos utilizados se describen en la tabla 3, y los oligonucleótidos empleados en la tabla 4.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas empleadas.

Microorganismo	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 λ<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1</i>	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> PAK6	Δ <i>guaBguaA::gm</i> Δ <i>deo-11</i>	(Kaminski, 2002)*
<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> CECT 4074	Cepa silvestre	(Larkin et al, 1967)
<i>Bacillus subtilis</i> BG 214	<i>rec<sup>+</sup> amyE aatSPB aatICEBs1 metB5 sigB37 trpC2 xre1</i>	(Yadav et al, 2012) <sup>†</sup>
<i>E. coli</i> PAK6 pSU19N	<i>E. coli</i> PAK6 recombinante que contiene pSU19N	Este trabajo
<i>E. coli</i> PAK6 pSU19N- <i>hBpndt</i>	<i>E. coli</i> PAK6 recombinante que contiene una construcción con el gen hipotético <i>Bpndt</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28a(+)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) recombinante que contiene pET28a(+)	Este trabajo
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28a(+)- <i>hBpndt</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) recombinante que contiene una construcción con el gen hipotético <i>Bpndt</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BG 214 pHT01	<i>B. subtilis</i> BG 214 recombinante que contiene pHT01	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BG 214 pHT01- <i>hBpndt</i>	<i>B. subtilis</i> BG 214 recombinante que contiene una construcción con el gen hipotético <i>Bpndt</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28a(+)- <i>Bpndt</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) recombinante que contiene una construcción con el gen <i>Bpndt</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28a(+)- <i>Bpndt-6his</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) recombinante que contiene una construcción con el gen <i>Bpndt-6his</i>	Este trabajo

\*Cepa proporcionada por el Dr. Pierre Alexandre Kaminski del Instituto Pasteur de París.

<sup>†</sup> Cepa proporcionada por el Dr. Juan Carlos Alonso del Centro Nacional de Biotecnología, Madrid.

**Tabla 3.** Plásmidos empleados.

Plásmido	Descripción	Referencia
pUC19	Ap <sup>r</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i>	(Yanisch-Perron et al, 1985)
pSU19N	Cm <sup>r</sup> , derivado de pUC19	(Bartolomé et al, 1991)*
pET28a(+)	Km <sup>r</sup> , vector de clonación e hiperexpresión, <i>oriColE1</i>	Novagen
pHT01	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , <i>oriColE1</i>	MoBiTec GmbH
pSU19N- <i>hBpndt</i>	Construcción derivada de pSU19N que contiene el gen hipotético <i>Bpndt</i>	Este trabajo
pET28a(+)- <i>hBpndt</i>	Construcción derivada de pET28 que contiene el gen hipotético <i>Bpndt</i>	Este trabajo
pHT01- <i>hBpndt</i>	Construcción derivada de pHT01 que contiene el gen hipotético <i>Bpndt</i>	Este trabajo
pET28a(+)- <i>Bpndt</i>	Construcción derivada de pET28 que contiene el gen <i>Bpndt</i>	Este trabajo
pET28a(+)- <i>Bpndt-6his</i>	Construcción derivada de pET28 que contiene el gen <i>Bpndt-6his</i>	Este trabajo

\*Plásmido proporcionado por el Dr. Pierre Alexandre Kaminski del Instituto Pasteur de París.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización	Referencia
RP23	AGCGGATAACAATTTACACAGG	Secuenciación fragmentos DNA clonados en pSU19	Dr P.A. Kaminski (sin publicar)
FP23	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACG	Secuenciación fragmentos DNA clonados en pSU19	Dr P.A. Kaminski (sin publicar)
T7p	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación fragmentos DNA clonados en pET28a(+)	Invitrogen
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Secuenciación fragmentos DNA clonados en pET28a(+)	Invitrogen
BpNcoI	CATGCCATGGATTGAAATTAT T	Clonación gen <i>hBpndt</i> en pET28a(+)	Este trabajo
BpEcoRI	CCGGAATTCCTTATCCATTATTT TTTAA	Clonación gen <i>hBpndt</i> en pET28a(+)	Este trabajo
BpXbaIBs	TGCTCTAGAATGGATTGAAAT TATT	Clonación gen <i>hBpndt</i> en pHT01	Este trabajo
BpSmaIBs	CCCCGGGTTATTCCATTATTTT TTTAATTGC	Clonación gen <i>hBpndt</i> en pHT01	Este trabajo
BpsecNcoI	CCCATGGCGAAAATTTACCTAG CTTACCAT	Clonación <i>Bpndt</i> en pET28a(+)	Este trabajo
BpsecEcoRI	GGAATTCCTTATTTAACTGCTTTT AAGTACGGTTTAATAGG	Clonación <i>Bpndt</i> en pET28a(+)	Este trabajo
BpHisNcoI	GCCATGGGCCATCATCATCATC ATCATCACATGGCGAAAATTTA CCTAGCTTCACC	Clonación <i>Bpndt-His</i> en pET28a(+)	Este trabajo

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización	Referencia
Y5Ffw	ATGGCGAAAAATTTCTAGCTT CACCATTTTTTAACG	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
Y5Frv	CGTTAAAAAATGGTGAAGCTA GGAAAAATTTTCGCCAT	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
Y5Hfw	ATGGCGAAAAATTCACCTAGCTT CACCATTTTTTAACG	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
Y5Hrv	CGTTAAAAAATGGTGAAGCTA GGTGAATTTTCGCCAT	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
Q40Efw	GGACATACTGTATTTTCACCGA GAGAAAATGAATTACCTGAAG TTGAATT	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
Q40Erv	AATTCAACTTCAGGTAATTCAT TTTCTCTCGGTGAAAATACAGT ATGTCC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
Q40Kfw	GACATACTGTATTTTCACCGAG AGAAAAATAAATTACCTGAAGTT G	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
Q40Krv	CAACTTCAGGTAATTTATTTTCT CTCGGTGAAAATACAGTATGTC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
D59Nfw	GAATGGCGCACATTCGTATTCA AGAATAACTTGGAACATATCAA	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
D59Nrv	TTGATATGTTCCAAGTTATTCTT GAATACGAATGTGCGCCATTC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
D59Hfw	ATGGCGCACATTCGTATTCAAG AATCACTTGGAACATATC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
D59Hrv	GATATGTTCCAAGTGATTCTTG AATACGAATGTGCGCCAT	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
D79Nfw	ATTATCGGAGATAACTATGATA ATACAGGTACTGCATGGGAAC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
D79Nrv	GTTCCCATGCAGTACCTGTATT ATCATAGTTATCTCCGATAAT	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
D79Hfw	ATCGGAGATAACTATGATCATA CAGGTACTGCATGGG	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
D79Hrv	CCCATGCAGTACCTGTATGATC ATAGTTATCTCCGAT	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
E85Dfw	GGTACTGCATGGGATCTGGGC GCCTCTTA	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
E85Drv	TAAGAGGCGCCAGATCCCAT GCAGTACC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
E85Qfw	GATACAGGTACTGCATGGCAG CTGGGCGCCTCTTATATT	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
E85Qrv	AATATAAGAGGCGCCAGCTG CCATGCAGTACCTGTATC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
E85Hfw	GATACAGGTACTGCATGGCATC TGGGCGCCTCTTATATT	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
E85Hrv	AATATAAGAGGCGCCAGATG CCATGCAGTACCTGTATC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo



Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización	Referencia
N107Dfw	CAACCGGCGAGATCATCGACCT TATGATTACGGAC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
N107Drv	GTCCGTAATCATAAGGTCGATG ATCTCGCCGGTTG	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
N107Hfw	CAACCGGCGAGATCATCCACCT TATGATTACGGAC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
N107Hrv	GTCCGATATCATAAGGTGGAT GATCTCGCCGGTTG	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
K142Yfw	CCGTACTTAAAAGCAGTTTACT AAAATTCGAGCTCCGTCGAC	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
K142Yrv	GTCGACGGAGCTCGAATTTTAG TAAACTGCTTTTAAGTACGG	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
ΔK142fw	CGACGGAGCTCGAATTTTAAAC TGCTTTTAAGTACGGT	Mutagénesis dirigida	Este trabajo
ΔK142rv	ACCGTACTTAAAAGCAGTTTAA AATTCGAGCTCCGTCG	Mutagénesis dirigida	Este trabajo

Las regiones subrayadas muestran la diana de la enzima de restricción incluida en el nombre del oligonucleótido.

### 3. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo empleados en este trabajo fueron esterilizados en autoclave mediante calor húmedo a 121 °C y 1 atmósfera de presión o mediante filtración a través de filtros estériles Millipore (Estados Unidos) de 0,22 µm.

#### 3.1. Medios empleados para el cultivo de los distintos microorganismos

1. Los medios empleados para el cultivo de las distintas cepas de *Escherichia coli* fueron:

Medio rico Luria-Bertani (LB) (Bertani, 1951; Sambrook et al, 2001) para el crecimiento de *E. coli* DH5α y BL21 (DE3). La cepa *E. coli* PAK 6 auxótrofa para guanina (proporcionada por el Dr. Kaminski) se creció en medio mínimo M9 (Sambrook et al, 2001) suplementado con 20 % (p/v) de glucosa como fuente de carbono y guanina 0,3 mM o desoxiguanosina y adenina 0,3 mM.

2. *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se creció en medio rico *Nutrient Broth* I, compuesto por extracto de carne 0,5 % (p/v), peptona 1 % (p/v), cloruro sódico 0,5 % (p/v), pH 7,2.

3. El medio de cultivo empleado en la preparación de células competentes de *Bacillus subtilis* BG214 fue GM1 (glucosa 0,5 %, extracto de levadura 1 %, hidrolizado de caseína 0,04 %, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM, L-metionina 0,02 mg/mL, D/L triptófano 25 µg/mL, sal Spizizen 10X). 100 mL

de sal Spizizen contienen 2 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 14 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1 g de citrato de sodio. El medio que se utilizó para llevar a cabo la transformación fue el medio GM2, compuesto por el medio GM1,  $\text{MgSO}_4$  3,3 mM y  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM.

En todos los casos se añadió 2 % (p/v) de agar para la preparación de medio sólido.

Cuando fue necesario añadir antibióticos, estos se prepararon en agua, excepto el cloranfenicol que se disolvió en etanol 100 % (v/v), y se filtraron antes de almacenarlos a -20 °C. Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones: Ampicilina (Ap) 100 µg/mL, kanamicina (Km) 50 µg/mL, cloranfenicol (Cm) 30 µg/mL y gentamicina (Gm) 10 µg/mL.

### 3.2. Condiciones de cultivo

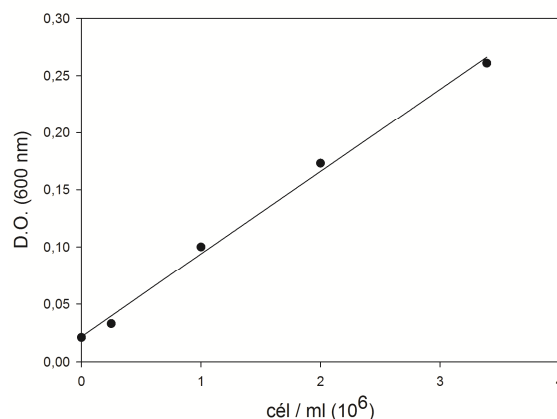
Las cepas de *E. coli* y *B. subtilis* se cultivaron a 37 °C, 250 r.p.m., mientras que *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se cultivó a 20 o 28 °C, 250 r.p.m. en un incubador termostatzado con agitación orbital *Infors HT Unitron* (Suiza).

### 3.3. Conservación de las cepas bacterianas

Respecto a la conservación de cepas bacterianas, para periodos de tiempo cortos inferiores a dos semanas se conservaron en placa de medio sólido a 4 °C. Para su mantenimiento a largo plazo, las bacterias se congelaron a -80 °C en presencia de glicerol 20 % (v/v).

### 3.4. Cuantificación del crecimiento de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 en medio líquido

La cuantificación del crecimiento de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se llevó a cabo mediante la determinación del incremento del número de células con el tiempo de incubación. Para ello se construyó una recta patrón a partir de una suspensión de *B. psychrosaccharolyticus* crecida durante 18 h a 20 °C de la que se hicieron diluciones seriadas y se determinaron tanto la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un espectrofotómetro *Beckman Coulter DU 800* (Estados Unidos) como el número de células mediante cuantificación con una cámara de *Neubauer* (BlauBrand, Alemania) (Figura 21).



**Figura 21.** Representación de la variación de la D.O. (600 nm) con el número de células presentes en 1 mL de suspensión de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074.

La ecuación obtenida a partir de la recta patrón fue [1]

$$\text{D. O. (600 nm)} = 7.21 \times [\text{cel}] \left( \frac{10^4 \text{ cel}}{\text{mL}} \right) + 0.0218 \quad [1]$$

A continuación, se llevó a cabo la determinación de la curva de crecimiento de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 a 20 °C y 28 °C. Con este fin se inoculó un matraz con 250 mL de medio de cultivo con  $2 \times 10^6$  células y se incubó a 20 °C o 28 °C con agitación (250 r.p.m.). Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se determinó su D.O. (600 nm), la cual se pudo relacionar con el número de células a través de la ecuación [1].

## 4. Técnicas de manipulación y análisis de DNA

### 4.1. Purificación y secuenciación de DNA

La purificación del DNA genómico de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se llevó a cabo siguiendo el protocolo seguido por Kieser (Kieser et al, 2000). La purificación de DNA plasmídico se realizó con *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche, Alemania).

La secuenciación de DNA plasmídico se llevó a cabo mediante secuenciación automática en un equipo *ABI Prism 37 automated DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc, Estados Unidos), en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA gestionado por la empresa Secugen S. L. en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó con el programa Chromas 2.4 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

## 4.2. Reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del DNA mediante PCR (Mullis et al, 1986) se realizó en un equipo *Mastercycler Personal* (Eppendorf, Alemania) utilizando una mezcla de reacción con oligonucleótidos 0,8  $\mu$ M, dNTPs 0,25 mM y *Pfu*DNA polimerasa. Para la clonación del gen *hBpndt* en pET28a(+) se emplearon los oligonucleótidos BpNcoI y BpEcoRI, mientras que para la clonación de dicho gen en pHT01 se utilizaron BpXbaI y BpSmaI (Tabla 4). La clonación del gen *Bpndt* en pET28a(+) se realizó empleando los oligonucleótidos BpsecNcoI y BpsecEcoRI. Por último, para la clonación del gen *Bpndt-6his* en pET28a(+) se utilizaron los oligonucleótidos BpHisNcoI y BpsecEcoRI (Tabla 4).

El programa empleado en todos los casos se encuentra reflejado en la tabla 5.

**Tabla 5.** Programa de amplificación por PCR.

Amplificación <i>Bpndt</i>
1. Desnaturalización 5 min, 95 °C
2. Hibridación 10 min, 45 °C
3. Extensión 2 min, 72 °C
4. Desnaturalización 1 min, 95 °C
5. Hibridación 2 min, 45 °C
6. Extensión 2 min, 72 °C
7. Repetición 30 ciclos de los pasos 4, 5 y 6
8. Extensión 20 min, 72 °C

El producto de amplificación se purificó empleando el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Alemania).

## 4.3. Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA se llevó a cabo en geles de agarosa 0,8 % (p/v) en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, EDTA 2 mM, ácido acético 20 mM, pH 8,0) utilizando un equipo *Run One Electroforesis Cell* (Embitec, Estados Unidos) a corriente constante de 8 V/cm. El tampón empleado para aplicar las muestras de DNA está compuesto por azul de bromofenol 0,2 % (p/v) y glicerol 25 % (v/v), mientras que la tinción de las bandas se llevó a cabo con GelRed y posterior visualización con luz ultravioleta utilizando un equipo *UVIPro V1-0* (UVIttec Limited, Reino Unido).

## 5. Construcción y análisis de una genoteca de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074

100 µg de DNA genómico de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se digirieron parcialmente con 28 U de la enzima de restricción *AluI* durante 15 minutos a 37 °C, parando la reacción a 65 °C durante 20 minutos. El resultado se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa y se aislaron y purificaron los fragmentos de 1, 1,5 y 2 Kb mediante extracción de banda del gel utilizando el *GeneClean Turbo Kit* (MP Biomedicals, Estados Unidos). Los distintos fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pSU19N (Bartolomé et al, 1991) (Tabla 3) previamente digerido con *SmaI* utilizando la DNA ligasa de T4 durante 18 h a 16 °C. La genoteca generada se almacenó a -20 °C.

### 5.1. Cribado funcional

Una vez generada la genoteca de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074, se realizó el cribado funcional empleando la cepa *E. coli* PAK6, auxótrofa de guanina (proporcionada por el Dr. Kaminski). Para ello, las células de *E. coli* PAK6 se transformaron mediante electroporación (Dower et al, 1988) (apartado 8.1 de Materiales y Métodos) con la librería de plásmidos obtenida (pSU19N-fragmento DNA), y se sembraron en placas de medio mínimo M9 suplementado con 20 % de glucosa, Cm (30 µg/mL), dGua y Ade 0,3 mM e IPTG 1 mM para inducir la expresión. Las colonias crecidas se aislaron en LB:Cm (30 µg/mL) para su posterior secuenciación.

## 6. Secuenciación del DNA genómico de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074

La secuencia del genoma de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se obtuvo a partir de una librería genómica que se secuenció utilizando un *GS FLX Titanium Sequencing Kit* en un instrumento *Genome Sequencer FLX* (Roche Diagnostics, Alemania) en la Fundación Parque Científico de Madrid. Se obtuvieron un total de 2,2 millones de lecturas (cobertura de 19 veces) que fueron ensambladas mediante el software Newbler 2.5.3, dando lugar a 405 *contigs*. A continuación, para mejorar la calidad de la secuencia, se realizó una secuenciación adicional empleando un equipo *Illumina Miseq* en la Unidad de Genómica de Cantoblanco (Madrid). En este caso se obtuvieron 5,29 millones de lecturas (cobertura de 168 veces), que fueron ensambladas manualmente en colaboración con el grupo del Dr. José Luis García (Centro de Investigaciones Biológicas), reduciendo el número de *contigs* a 265. Los marcos de

lectura abiertos (ORFs) y los genes se identificaron utilizando el servidor RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Aziz et al, 2008), y el programa BioEdit *Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999).

## 7. Clonación de genes de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074

### 7.1. Clonación en pET28a(+)

El hipotético gen *ndt* identificado a partir del cribado funcional de la genoteca de *B. psychrosaccharolyticus* en *E. coli* PAK6 (*hBpndt*) se amplificó mediante PCR empleando los oligonucleótidos BpNcoI y BpEcoRI (Tabla 4), utilizando el DNA genómico de *B. psychrosaccharolyticus* como molde y las condiciones descritas en la tabla 5. El fragmento de DNA amplificado se digirió con las enzimas de restricción NcoI y EcoRI durante 1 h a 37 °C y se ligó al vector de expresión pET28a(+) previamente digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido recombinante pET28a(+)-*hBpndt* (Tabla 3).

Por otro lado, la secuenciación del DNA genómico de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 permitió la identificación de otro hipotético gen *ndt* de *B. psychrosaccharolyticus* (*Bpndt*) al alinear la secuencia del genoma del microorganismo con los genes *ndt* y las proteínas DRT descritas, empleando los algoritmos BlastN y BlastP respectivamente (Altschul et al, 1990) a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y del programa BioEdit *Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999). Para los alineamientos múltiples de secuencias se empleó el programa ClustalW (Thompson et al, 1994) mediante el servidor EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). El gen *Bpndt* se amplificó mediante PCR empleando los oligonucleótidos BpsecNcoI y BpsecEcoRI (Tabla 4), utilizando el DNA genómico de *B. psychrosaccharolyticus* como molde y las condiciones descritas en la Tabla 5. Tanto el fragmento de DNA amplificado como el vector de expresión pET28a(+) se digirieron con las enzimas de restricción NcoI y EcoRI durante 1 h a 37 °C y se ligaron empleando la DNA ligasa T4, obteniéndose el plásmido recombinante pET28a(+)-*Bpndt* (Tabla 3).

Para introducir una secuencia que codifica 6 histidinas en el extremo 5' de *Bpndt*, el gen *Bpndt* se amplificó mediante PCR empleando los oligonucleótidos BpHisNcoI y BpsecEcoRI (Tabla 4) para, utilizando pET28a(+)-*Bpndt* como molde y las condiciones descritas en la Tabla 5. El fragmento de DNA amplificado se digirió con las enzimas de restricción NcoI y EcoRI durante 1 h a 37 °C y se ligó al vector de expresión pET28a(+) digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido recombinante pET28a(+)-*Bpndt-6his*.

En todos los casos, los plásmidos recombinantes obtenidos se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) para permitir la expresión del gen (apartado 8.1 de Materiales y Métodos).

## 7.2. Clonación en pHT01

El hipotético gen *ndt* obtenido a partir de la genoteca de *B. psychrosaccharolyticus* en *E. coli* PAK6 (*hBpndt*) se amplificó mediante PCR empleando los oligonucleótidos BpXbaIBs y BpSmaIBs (Tabla 4), utilizando el DNA genómico de *B. psychrosaccharolyticus* como molde y las condiciones descritas en la Tabla 5. El fragmento génico amplificado se digirió con las enzimas de restricción *XbaI* y *SmaI* durante 1 h a 37 °C y se ligó al vector de expresión pHT01 previamente digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido recombinante pHT01-*hBpndt* (Tabla 3). Esta construcción se empleó para transformar células de *B. subtilis* BG214 como se describe en el apartado 8.2. de Materiales y Métodos.

## 8. Transformación de cepas bacterianas

### 8.1. Transformación de cepas de *E. coli*

Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  y BL21(DE3) se transformaron utilizando el procedimiento de choque térmico, lo que requiere la preparación previa de células competentes con RbCl (Sambrook et al, 2001). El DNA plasmídico o la mezcla de ligación plásmido-inserto se incubaron con las células competentes en baño de hielo durante 30 minutos, a continuación 90 segundos a 42 °C y de nuevo en baño de hielo 2 minutos. Las células se incubaron 1h a 37 °C con 1 mL de LB, se sembraron en placas Petri con el medio sólido selectivo adecuado y se incubaron de nuevo a 37 °C hasta la aparición de colonias. La selección de las colonias se realizó mediante la incubación de las mismas con 15  $\mu$ L de tampón de ruptura (lisozima 0,5 mg/mL, EDTA 0,025 M, Tris 0,025 M pH 7,5, RNasa 0,1 M, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0,02 %) durante 15 minutos, adición de 2  $\mu$ L de fenol, agitación en vortex y visualización en gel de agarosa 0,8 % (apartado 4.3. de Materiales y Métodos).

Las células de *E. coli* PAK6 (Kaminski, 2002; Sambrook et al, 2001) se transformaron mediante electroporación (Dower et al, 1988). Para la preparación de células electrocompetentes se inocularon 100 mL de LB:Gm (10  $\mu$ g/mL) con dichas células, se incubaron a 37 °C, 250 r.p.m. hasta alcanzar una densidad óptica (600 nm) de 0,6, se centrifugaron a 3000 $\times$ g, 4 °C durante 15 minutos y se realizaron 4 lavados con agua estéril Milli Q. Las células electrocompetentes

obtenidas se transformaron mediante un pulso de 2,5 kW en un equipo *MicroPulser* (Bio-Rad, Estados Unidos). Se añadió 1 mL de LB y se incubó durante 1 h a 37 °C. Se centrifugaron las células durante 2 min, se resuspendieron en el medio mínimo M9 y la selección de colonias se realizó según el apartado 5.1 de Materiales y Métodos.

## 8.2. Transformación de células de *Bacillus subtilis*

En primer lugar se prepararon células competentes de *B. subtilis* BG214. Para ello, se inocularon 5 mL de medio GM1 con un preinóculo crecido durante 18 h, alcanzando una D.O. (600 nm) de 0,2, y se midió la D.O. (600 nm) cada hora. Al cabo de 30 min después de haber alcanzado la fase estacionaria, se añadió glicerol hasta alcanzar una concentración del 10 % (v/v), se dividió el cultivo en alícuotas de 500 µL y se congelaron las células a -80 °C.

Para transformar estas células con un plásmido o mezcla de ligación, se inocularon 5 mL de medio GM2 con un vial de competentes y se incubó durante 2 h a 37 °C en agitación. Se dividieron en alícuotas de 200 µL y a cada una se le añadió el DNA de interés (menos de 200 ng) y se incubó 1 h a 37 °C en agitación. Se sembró en placa Petri con LB, Cm (30 µg/mL) y se incubó a 37 °C hasta la aparición de colonias. La selección de las colonias se realizó mediante la incubación de las mismas con 15 µL de tampón de ruptura durante 15 minutos, adición de 2 µL de fenol, agitación en vortex y visualización en gel de agarosa 0,8 % (apartado 4.3 de Materiales y Métodos).

Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Juan Carlos Alonso en el Centro Nacional de Biotecnología.

## 9. Producción y purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* (BpNDT)

La producción y purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* (BpNDT) se abordó mediante dos estrategias, a partir del microorganismo productor y a partir de la cepa recombinante de *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*Bpndt*.



### 9.1. Expresión del gen *ndt* de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 en *E. coli* BL21 (DE3)

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) portadoras del plásmido pET28a(+)-*Bpndt* que contiene el gen *ndt* de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se cultivaron en medio LB con Km (50 µg/mL) a 25, 30 y 37 °C, 250 r.p.m. en un incubador *Infors HT Unitron* (Suiza). A partir de un preinóculo de estas células se inocularon 100 mL de medio a D.O. (600 nm) de 0,1. Cuando el cultivo alcanzó D.O. (600 nm) de 0,6 se adicionó el inductor IPTG 0,1-0,5 mM, se incubó durante 3 h a la misma temperatura y se recogieron las células por centrifugación a 3500 ×g durante 15 minutos a 4°C. Estas se lavaron dos veces con tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,0 (tampón A) y se lisaron mediante sonicación. Para ello se resuspendieron en 2 mL de tampón A y se sonicaron en un sonicador *Digital Sonifier* (Branson, Estados Unidos) aplicando 8-10 ciclos de 30 segundos con una amplitud del 30 % a intervalos de 0,6 segundos. A continuación se centrifugaron a 17000 ×g durante 20 minutos a 4 °C y se separó el sobrenadante del precipitado obtenido. Ambos se analizaron mediante electroforesis PAGE-SDS para determinar si la proteína se expresaba de forma soluble o en cuerpos de inclusión.

### 9.2. Purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* (*BpNDT*)

Las células de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 procedentes de 2 L de caldo de cultivo *Nutrient Broth* (apartado 3.1 de Materiales y Métodos) se centrifugaron a 3500 ×g, 4 °C durante 15 minutos, se lavaron dos veces con tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,0 (tampón A), se resuspendieron en 15 mL del mismo tampón y se sonicaron aplicando 10 ciclos de 30 segundos a intervalos de 0,5 segundos, con amplitud del 30-40 %. A continuación se centrifugaron a 17000 ×g durante 20 minutos a 4 °C para separar el extracto celular del precipitado obtenido.

#### Cromatografía de intercambio aniónico

Los 15 mL de extracto celular en tampón A se aplicaron en la columna *Bio-scale Mini UNO-sphere Q cartridge* (volumen de lecho 10 mL, 80 × 11,2 mm de diámetro interno) equilibrada en el mismo tampón a flujo 0,5 mL/min empleando un equipo *BioLogic LP* (Bio-Rad, Estados Unidos). A continuación se llevó a cabo el lavado de la columna con tampón A hasta que la absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) disminuyó a cero, dato recogido a través del programa *LP Data View*. A continuación se procedió a eluir la *BpNDT* empleando un gradiente continuo de 0 a 1,0 M de NaCl en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,0 (tampón B), seguido de una elución

isocrática en tampón B a flujo de 1,0 mL/min hasta observar  $A_{280}$  cero en las fracciones eluidas. Todas las fracciones se recogieron en un colector de fracciones modelo 2110 (Bio-Rad, Estados Unidos).

La presencia de *Bp*NDT se detectó mediante ensayo de actividad cuando se emplearon células del microorganismo productor (apartado 10.2 de Materiales y Métodos) o mediante electroforesis PAGE-SDS cuando se utilizaron células de la cepa recombinante de *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*Bpndt* (apartado 11.1. de Materiales y Métodos). Las fracciones que contenían la enzima se juntaron y concentraron en un lecho de PEG 35000 Da para proceder a un segundo paso cromatográfico.

### **Cromatografía de exclusión molecular**

Las fracciones seleccionadas y concentradas tras el intercambio aniónico se cargaron en una columna *Superosa 12 10/300 GL* (GE Healthcare, Estados Unidos) equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0 (tampón C) a flujo 0,5 mL/min. La cromatografía se llevó a cabo mediante un sistema de cromatografía rápida para proteínas *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC, Amersham-Pharmacia, Estados Unidos). Se recogieron fracciones hasta observar que la  $A_{280}$  disminuyó a cero.

Al igual que en el paso anterior, se detectó la presencia de *Bp*NDT mediante ensayo de actividad o electroforesis PAGE-SDS y las fracciones de interés se juntaron y dializaron para cambiar el tampón a imidazol 25 mM, pH 7,4 (tampón D).

Se determinó el volumen de elución de 4 proteínas de masa molecular conocida, citocromo C (12,3 kDa), anhidrasa carbónica (26 kDa), albúmina de suero bovino (66,5 kDa) y alcohol deshidrogenasa (146,8 kDa), para, a partir de la relación entre su masa molecular y su volumen de elución, calcular la masa molecular en solución de *Bp*NDT.

### **Cromatografía de isoenfoque**

Para proceder a separar las proteínas restantes según su punto isoeléctrico (pI), se utilizó una columna *Mono P 5/200 GL* (GE Healthcare, Estados Unidos) equilibrada en tampón D. La muestra se cargó a flujo 1 mL/min y se eluyó empleando el tampón comercial *Polybuffer 74*, pH 4,0 (GE Healthcare, Estados Unidos) (tampón E). Se recogieron fracciones hasta observar  $A_{280}$  cero y pH 4,0. A continuación, para eliminar todas aquellas proteínas no eluidas, se lavó la columna con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0, NaCl 0,5 M.

### 9.3. Purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* (BpNDT) recombinante mediante la introducción de una etiqueta de 6 histidinas (BpNDT<sub>6his</sub>)

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*Bpndt-6his* procedentes de 750 mL de caldo de cultivo se lisaron mediante sonicación y se centrifugaron para separar el extracto celular de los desechos celulares (apartado 9.1 de Materiales y Métodos). El extracto celular se cargó en una columna de Níquel-agarosa (Nickel Rapid Run Cartridge-1mL, ABT) equilibrada en tampón A' (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM pH 7,5) a flujo 1 mL/min. Después de lavar la columna con tampón A' durante 20 min, se eluyó la proteína de interés con tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM pH 7,5 (tampón B'). Se analizaron las fracciones mediante PAGE-SDS, se juntaron aquellas que contenían la BpNDT-6His y se dializaron en tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,0.

## 10. Ensayo de actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa

El método de valoración de la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa empleado en este trabajo se basó en la cuantificación mediante HPLC de los 2'-desoxirribonucleósidos formados a partir de un 2'-desoxirribonucleósido y una base de partida.

### 10.1. Ensayo de actividad empleando células enteras de *Bacillus psychrosaccharolyticus*

Con el objetivo de determinar la actividad empleando células enteras, 20 mL de medio de cultivo se inocularon con  $2 \times 10^6$  células de *B. psychrosaccharolyticus* y se incubaron 18 h a 28 °C en un agitador orbital *Infors HT Unitron* a 250 r.p.m. El cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 3000  $\times g$ , 4 °C, las células se resuspendieron en 4 mL de adenina (Ade) y 2'-desoxiuridina (dUrd) 5 mM en tampón MES 50 mM pH 6,5 y se incubaron durante 1 h a 57 °C y 110 r.p.m. en un baño de agua *Shel-Lab* (Estados Unidos). La reacción se paró mediante incubación a 95 °C durante 5 minutos y la mezcla de reacción se incubó 5 minutos en hielo y se centrifugó a 13000  $\times g$ . El sobrenadante se diluyó a la mitad y la formación de 2'-desoxiadenosina (dAdo) se analizó mediante HPLC.

## 10.2. Ensayo de actividad empleando *Bp*NDT pura

La reacción estándar se llevó a cabo incubando 0,2-0,4 µg de enzima pura con 2'-desoxiuridina y adenina 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8,0 en volumen final de 40 µL. La reacción se llevó a cabo a 40 °C, 30 r.p.m. durante 5 minutos y se paró mediante la adición de un volumen de metanol frío y posterior incubación a 95 °C, 5 minutos. Después de centrifugar 2 minutos a 9000 ×g, la muestra se diluyó a la mitad con agua y mediante HPLC se cuantificó la aparición de 2'-desoxiadenosina.

La actividad enzimática se cuantificó en unidades internacionales (IU), definidas como la cantidad de enzima que produce un µmol de 2'-desoxirribonucleósido por minuto en las condiciones de ensayo. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Los tiempos de retención de cada uno de los sustratos y productos fueron los siguientes:

Uracilo (Ura): 5,41 min; 2'-desoxiuridina (dUrd): 9,16 min; adenina (Ade): 10,14 min; 2'-desoxiadenosina (dAdo): 15,50 min.

Para el análisis de los productos se utilizó un equipo HPLC *Agilent series 1100* (Agilent, Estados Unidos) con bomba cuaternaria 126, auto muestreador, detector de arreglo de diodos, degasificador y detector de onda variable. La columna utilizada fue ACE 5µm C18-PFP 250x4,6 mm (ACE, Reino Unido). Se empleó como fase móvil un gradiente compuesto por:

De 0 a 10 min: 100 % - 90 % acetato de trimetilamonio 10 mM; 0 - 10 % acetonitrilo

De 10 a 20 min: 90 % -100 % acetato de trimetilamonio 10 mM; 10 - 0 % acetonitrilo

Flujo 1,0 mL/min, longitud de onda de detección 254 nm ( $Abs_{254\text{ nm}}$ ).

## 11. Técnicas de análisis de proteínas

### 11.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

Las electroforesis de proteínas se llevaron a cabo en condiciones desnaturalizantes, en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) 0,1 % (p/v). En las electroforesis utilizadas para realizar posteriormente una electrotransferencia a membrana, la concentración de SDS fue 0,2 % (p/v). La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (Laemmli, 1970), empleando geles de poliacrilamida en placa (PAGE) a una concentración 4 % en la zona concentrante y 12,5-15 %

en la separadora. Las muestras se calentaron 10 minutos a 100 °C en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 10 % (v/v), SDS 2 % (p/v), β-mercaptoetanol 5 % (v/v) y azul de bromofenol 0,005 % (p/v)). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y 25 mA por gel en un equipo *Mini Protean Tetra Cell* (Bio-Rad, Estados Unidos) utilizando como electrolito Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v). La fijación de las proteínas se llevó a cabo incubando el gel con una solución de isopropanol 25 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v) durante 15 minutos con agitación en vaivén. A continuación se tiñó el gel incubándolo con una solución de azul brillante de Coomassie G250 0,012 % (p/v) en ácido acético 10 % (v/v) durante 1 h y el exceso de colorante se eliminó mediante el lavado en ácido acético 10 % (v/v). Los marcadores de masa molecular utilizados, *Broad Range* de Bio-Rad (Estados Unidos), están compuestos por miosina (200 kDa), β-galactosidasa (116,25 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), albúmina de suero bovino (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina de soja (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) y aprotinina (6,5 kDa).

### **11.2. Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF y análisis de la secuencia amino terminal**

Para la secuenciación del extremo amino terminal de la proteína, se realizó una electroforesis de la misma siguiendo las condiciones descritas en el apartado anterior y se transfirió la proteína a una membrana *Immobilon P* en una cubeta de transferencia *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad, Estados Unidos) a 20 mA durante toda la noche, empleando como electrolito Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM, SDS 0,2 % (p/v) y añadiendo tioglicolato (10 µg/mL) al tampón del electrodo superior. La detección de bandas proteicas en la membrana se llevó a cabo mediante tinción con Negro amido 0,1 % (p/v) en ácido acético 10 % (v/v).

La banda en la que se encontraba la proteína de interés se cortó y se secuenció en un secuenciador de proteínas *Applied Biosystems* del servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), España.

### **11.3. Determinación de la concentración de proteína**

La determinación de la concentración de proteína presente en una muestra se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo comercial *Bio Rad Protein Assay* (Bio-Rad, Estados Unidos). Se añadieron 80 µL de reactivo a 40 µL de muestra y se completó con agua destilada hasta 400 µL. Tras agitar vigorosamente, la reacción se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de las

muestras a 595 nm en un lector de placas *Digiscan Microplate Reader V3.0* (Asys Hitech, Austria).

La recta patrón se realizó empleando disoluciones de concentraciones conocidas en un intervalo comprendido entre 2,5 y 30 µg/mL de albúmina de suero bovino (BSA).

#### 11.4. Cálculo del coeficiente de extinción molar (ε)

El coeficiente de extinción molar (ε) se determinó mediante el método de Edelhoch (Edelhoch, 1967) empleando la siguiente ecuación [2]:

$$\frac{A_{nat}}{A_{des}} = \frac{\epsilon_{nat}}{\epsilon_{des}} \quad [2]$$

Donde  $A_{nat}$  y  $\epsilon_{nat}$  son el valor de absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción molar de *BpNDT* en condiciones nativas; mientras que  $A_{des}$  y  $\epsilon_{des}$  son el valor de absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción molar de *BpNDT* desnaturalizada.  $\epsilon_{des}$  se calculó a partir de la secuencia de aminoácidos de *BpNDT* a través de la herramienta ProtParam del servidor ExPASy.

Para llevar a cabo estos experimentos se empleó *BpNDT* a concentración 70 µg/mL en tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,0. La desnaturalización de la proteína se consiguió mediante incubación con cloruro de guanidinio 6 M durante 3 h a 37 °C.

#### 11.5. Estudios de ultracentrifugación analítica

Se realizaron experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación para determinar el tamaño y estado de oligomerización de *BpNDT* en el Laboratorio de Ultracentrifugación Analítica e Interacciones Moleculares del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Estos experimentos se llevaron a cabo en una ultracentrífuga analítica *Optima XL-1* (Beckman-Coulter Inc., Estados Unidos), utilizando *BpNDT* a concentración 0,36 mg/mL en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0. El coeficiente de sedimentación de distribución,  $c(s)$ , y el coeficiente de sedimentación  $s$  se calcularon a partir de los datos de velocidad de sedimentación utilizando el programa SEDFIT 12.52 (Brown et al, 2006).

A partir de los datos obtenidos del equilibrio de sedimentación se calculó la masa molecular boyante utilizando el programa HETEROANALYSIS 1.1.44 (Cole, 2004), y este valor se empleó para determinar la masa molecular promedio con el programa SEDNTERP 201220111 BETA (Minton et al, 1997), teniendo en cuenta el volumen específico de la proteína (0,738 mL/g) obtenido a partir de la composición de aminoácidos.

### 11.6. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (Differential scanning calorimetry, DSC) se llevó a cabo en un *Microcalorímetro VP-DSC* (Microcal, Estados Unidos) empleando *BpNDT* pura (0,36 mg/mL) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0. Se realizaron 5 barridos entre 15 y 90 °C a una velocidad de barrido de 20 °C/hora. Para el análisis e interpretación de los datos se empleó el programa Microcal Origin.

### 11.7. Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrómetro de luminiscencia *SLM-Aminco-Bowman Series 2* (Estados Unidos) acoplado a un baño termostatzado *Julabo F-30* (Alemania) con celdas de paso óptico de 0,4 cm y 1 cm para excitación y emisión respectivamente, mientras que la anchura de rendija utilizada fue 4 mm en ambos casos. La  $\lambda_{exc}$  empleada fue 295 nm, mientras que la  $\lambda_{em}$  se varió en el intervalo de 295 a 420 nm. Se registraron espectros de fluorescencia de *BpNDT* pura (0,01 mg/mL) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0 entre 20 y 80 °C con un incremento de temperatura de 20 °C/hora.

### 11.8. Dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular (DC) de *BpNDT* pura se determinó utilizando un espectropolarímetro *Jasco J-715* (Estados Unidos) acoplado a un baño termostatzado *Neslab RTE-111* (Estados Unidos). Una solución de *BpNDT* a 0,32 mg/mL en tampón fosfato potásico 5 mM pH 7,0 se introdujo en una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico a 15 °C y se registró el espectro en la región del UV lejano, entre 185 y 260 nm. Los datos de DC se expresaron como elipticidad molar media de un residuo ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ), considerando que la masa molecular media de un aminoácido es 110 Da. La información sobre la estructura secundaria de *BpNDT* se obtuvo a partir del espectro utilizando el programa CDNN V2.1 (Bohm et al, 1992). La temperatura de desnaturalización de *BpNDT* se determinó mediante el estudio de la variación de la elipticidad molar a 210 nm en el intervalo de temperatura entre 20 °C y 80 °C.

### 11.9. Predicción de la estructura secundaria a través de programas informáticos

Para determinar la estructura secundaria de *BpNDT* de forma teórica se emplearon 7 programas informáticos distintos:

PSIPRED (McGuffin et al, 2000) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>); JPRED (Cole et al, 2008) (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>); SOPMA (Geourjon et al, 1995) (<http://npsa->

pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_automat.pl?page=npsa\_sopma.html); HHpred (Söding et al, 2005) (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>), SwissModel (Arnold et al, 2006) (<http://swissmodel.expasy.org/>), I-TASSER (Zhang, 2008) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) y QUARK Ab-Initio (Xu et al, 2012) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>). La visualización de las estructuras se llevó a cabo empleando el programa PyMol (DeLano, 2002).

#### 11.10. Modelado de la estructura tridimensional de *Bp*NDT

Los modelos tridimensionales de *Bp*NDT se generaron con las aplicaciones web HHPred (Söding et al, 2005) (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>), Swiss-model (Arnold et al, 2006) (<http://swissmodel.expasy.org/>), I-TASSER (Zhang, 2008) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), QUARK (Xu et al, 2012) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>) y Robetta (<http://robetta.bakerlab.org/>). La visualización de las estructuras se llevó a cabo empleando el programa PyMol (DeLano, 2002).

### 12. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de *Bp*NDT

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima se estudió incubando 0.2 µg de *Bp*NDT con adenina y 2'-desoxiuridina 10 mM entre 4 y 80 °C en tampón HEPES 50 mM pH 8 en condiciones estándar (apartado 10.2 de Materiales y Métodos).

La estabilidad de la enzima se determinó incubando *Bp*NDT pura (0,08 mg/mL) a distintas temperaturas, entre 10 y 90 °C, durante 15 minutos. A continuación, 0,2 µg de enzima se incubaron en hielo y se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática en la síntesis de 2'-desoxiadenosina a 40 °C en tampón HEPES 50 mM pH 8 mediante ensayo estándar.

A partir de los resultados experimentales del efecto de la temperatura sobre la actividad se procedió al cálculo de la energía de activación de *Bp*NDT mediante la ecuación de Arrhenius [3]:

$$\ln(v) = \ln(A) - \left(\frac{Ea}{R}\right) \cdot \frac{1}{T} \quad [3],$$

donde  $v$  es la actividad específica de la enzima,  $Ea$  es la energía de activación,  $T$  es la temperatura en grados Kelvin (K),  $R$  es la constante de los gases ideales ( $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y  $A$  es el factor exponencial.



### 12.1. Estudios de termoinactivación de *Bp*NDT

Los estudios de inactivación térmica se realizaron incubando *Bp*NDT (0,08 mg/mL) a distintas temperaturas en un intervalo de 40 °C a 70 °C. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de 5 µL de enzima, se incubaron en hielo durante 5 minutos y seguidamente se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática mediante el análisis de la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxicitidina y adenina 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8,0 en condiciones estándar (apartado 10.2 de Materiales y Métodos).

Los estudios de inactivación térmica se ajustaron al modelo que propone la existencia de dos estados enzimáticos (E y E<sub>d</sub>), siendo  $k_d$  el coeficiente de desactivación de primer orden. Los datos experimentales correspondientes a 60 y 70 °C se ajustaron a un decaimiento exponencial simple, ecuación [4] (Henley et al, 1985).

$$A = A_0 \cdot e^{-k_d t} \quad [4]$$

### 13. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de *Bp*NDT

Se determinó el pH óptimo para la actividad de *Bp*NDT utilizando timina y 2'-desoxiuridina 10 mM como sustratos en tampón citrato-fosfato -borato 10 mM a distintos valores de pH, entre 4,0 y 9,0. Se añadieron 0,4 µg de *Bp*NDT a 40 µL de mezcla de reacción, y el ensayo se llevó a cabo siguiendo las condiciones ya descritas (apartado 10.2 de Materiales y Métodos).

La estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH se estudió incubando *Bp*NDT pura en tampón citrato-fosfato-borato 10 mM entre pH 4,0 y 12,0 a fuerza iónica constante de 150 mM durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, 0,4 µg de enzima se emplearon para determinar la actividad enzimática mediante el análisis de la síntesis de timidina a 40 °C.

### 14. Efecto de la fuerza iónica y la presencia de cationes sobre la actividad de *Bp*NDT

Se estudió el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de la enzima mediante la determinación de la actividad 2'-desoxirribosiltransferasa en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (de 0 a 1,5 M). Para ello, el ensayo se llevó a cabo mediante la reacción estándar en tampón HEPES 50 mM pH 8,0 (apartado 10.2 de Materiales y Métodos).

Por otra parte, se estudió la influencia de distintos cationes monovalentes y divalentes sobre la actividad de *Bp*NDT. Para ello se añadieron las sales correspondientes a concentración 1 o 5 mM al ensayo estándar de síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina y adenina 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8,0. Las sales utilizadas para el estudio de los cationes monovalentes fueron  $K_2SO_4$ , KCl, LiCl,  $Na_2SO_4$ , NaCl y RbCl; mientras que para estudiar la presencia de los cationes divalentes se emplearon  $BaCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$  y  $ZnSO_4$ . Además, con el fin de estudiar otros cationes y aditivos, también se observó el efecto de  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $Al_2(SO_4)_3$ ,  $FeCl_3$ , EDTA y  $\beta$ -mercaptoetanol.

## 15. Estudio de la especificidad de sustrato de *Bp*NDT

Se determinó la capacidad de *Bp*NDT para sintetizar diversos nucleósidos naturales en las condiciones de ensayo descritas en el apartado 10.2 de Materiales y Métodos a partir de distintas bases y nucleósidos naturales.

Los tiempos de retención de cada uno de los sustratos y productos fueron los siguientes:

Uracilo (Ura): 5,41 min; 2'-desoxiuridina (dUrd): 9,16 min; adenina (Ade): 10,14 min; 2'-desoxiadenosina (dAdo): 15,50 min; hipoxantina (Hyp): 7,34 min; 2'-desoxiinosina (dIno): 10,95 min; citosina (Cyt): 4,14 min; 2'-desoxicitidina (dCyd): 8,22; timina (Thy): 9,13 min; timidina (Thd): 13,25; 2'-desoxiguanosina (dGua): 13,25 min.

Para determinar la actividad de *Bp*NDT en la síntesis de nucleósidos no naturales se emplearon concentraciones de sustratos más bajas y tiempos de reacción más largos que en el caso de los sustratos naturales, ya que la actividad de *Bp*NDT sobre los análogos es menor que sobre los naturales. Cuando los sustratos de partida fueron base no natural y nucleósido natural se utilizaron ambos a una concentración 2 mM y el tiempo de reacción se estableció en 2 h; mientras que si se partió de base natural y nucleósido no natural la concentración utilizada fue 1 mM y el tiempo de reacción 24 h.

Los tiempos de retención de cada uno de los sustratos y productos fueron los siguientes:

5-fluorouracilo (5-FUra): 5,94 min; 5-clorouracilo (5-ClUra): 8,71 min; 5-fluorocitosina (5-FCyt): 5,41 min; 5-bromouracilo (5-BrUra): 10,28 min; 5-yodouracilo (5-IUra): 13,10 min; 5-fluoro-2-methoxy-4(1H)pirimidinona (5-FMP): 8,47 min; 2,6-diaminopurina (2,6-DAP): 8,71 min; 6-mercaptopurina (6-M): 8,85 min; benzimidazol (B): 24,26 min; 5-azacitosina (5-azaCyt): 3,52

min; N-benzoadenina (N-BAd): 26,06 min; 5-etiluracilo (5-EtUra): 11,49 min; 2-fluoroadenina (2-FAd): 10,14 min; 5-trifluorotimina (5-TFTHy): 9,63 min; 7-deaza-6-hidroxipurina (7-DHP): 8,26 min; 4-hidroxi-2-mercapto-6-metilpirimidina (4-HMMeP): 6,94 min; 6-propil-2-tiouracilo (6-PTUra): 18,13 min; 6-metiluracilo (6-MeUra): 7,33 min; 5-hidroximetiluracilo (5-HMeUra): 4,71 min; 5-metilcitosina (5-MeCyt): 6,51 min; teofilina (Teo): 18,75 min; 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd): 9,8 min; 5-fluoro-2'-desoxicitidina (5-FdCyd): 9,16 min; 5-cloro-2'-desoxiuridina (5-ClUrd): 13,3 min; 5-bromo-2'-desoxiuridina (5-BrdUrd): 15,7 min; 5-yodo-2'-desoxiuridina (5-IdUrd): 17,73 min; 5-fluoro-2-metoxi-4(1H)pirimidinona-2'-desoxirribósido (5-FMPdRib): 13,42 min; 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribósido (2,6-DAPdRib): 14,29 min; 6-mercaptapurina-2'-desoxirribósido (6-MdRib): 11,96 min; benzimidazol-2'-desoxirribósido (BdRib): 28,95 min; 5-aza-2'-desoxicitidina (5-azadCyd): 7,14 min; 5-etil-2'-desoxiuridina (5-EtdUrd): 14,82 min; 2-fluoro-2'-desoxiadenosina (2-FdAdo): 15,41 min; 5-trifluorotimidina (5-TFTThd): 11,49 min; 7-deaza-6-hidroxipurina-2'-desoxirribósido (7-DHPdRib): 11,87 min; 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5-HMedUrd): 7,42 min; 5-metil-2'-desoxicitidina (5-MedCyd): 8,75 min; teofilina-2'-desoxirribósido (dTeo): 22,9 min; *arabinosil*-adenina (*araA*): 13,14 min; *arabinosil*-uracilo (*araU*): 8,68 min; 2'-fluoro-2'-desoxiuridina (DFU): 8,79 min; 2'-fluoro-2'-desoxicitidina (DFC): 8,7 min; 2'-fluoro-*ara*-uracilo (2'-FaraU): 12,73 min; 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (dFCyd): 8,07 min; 2'-O-metil-5-metilcitidina (O-dMeCyd): 12,81 min.

## 16. Determinación de los parámetros cinéticos de *Bp*NDT

Los parámetros cinéticos,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_m$  de *Bp*NDT fueron determinados para la reacción 2'-desoxicitidina (dCyd) y adenina (Ade) siguiendo las condiciones estándar. Para ello se varió uno de los sustratos en un intervalo de concentraciones entre 0,25 y 60 mM mientras el otro se mantuvo fijo a 1, 2,5, 5, 7,5, 10 ó 15 mM. Se ajustaron los datos a la ecuación de dobles inversas, para una reacción con dos sustratos y dos productos, ecuación [5] (Núñez de Castro, 2012).

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{mAB}} \left( 1 + \frac{k_B}{[B]} \right) + \frac{k_A}{V_{mAB}} \frac{1}{[A]} \quad [5]$$

### 16.1. Parámetros cinéticos a distintos valores de pH

Para determinar el efecto del pH sobre los parámetros cinéticos en la reacción de síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxicitidina y adenina se varió la concentración de dCyd entre 0,25 y 50 mM a concentraciones fijas del segundo sustrato, Ade 5 mM. Las reacciones se llevaron a cabo en un intervalo de pH entre 6,1 y 8,3 en tampón citrato/fosfato/borato 10 mM siguiendo las condiciones estándar.

Una vez se calcularon los parámetros cinéticos aparentes a cada uno de los valores de pH estudiados con el programa Hyper32, se determinaron los valores de  $pK_a$  de los grupos implicados en la catálisis ajustando los valores a la ecuación [6], y los  $pK_a$  de los grupos implicados en unión de sustrato ajustando los valores a la ecuación [7]. Para ello, se empleó el programa TableCurve 2D v5.01 (Systat Software Inc) en ambos casos.

$$V_{max} = \frac{V'_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{K_1^E} + \frac{k_2^E}{[H^+]}} \quad [6]$$

$$\frac{V_{max}}{K_m} = \frac{V'_{max}}{K'_m \left(1 + \frac{[H^+]}{K_1^E} + \frac{k_2^E}{[H^+]}\right)} \quad [7]$$

## 17. Cristalización de BpNDT

Con el fin de conocer la estructura de BpNDT con precisión, se llevó a cabo la cristalización de la enzima en el grupo de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto Rocasolano (CSIC), bajo la dirección del Dr. José Miguel Mancheño.

### 17.1. Proceso de cristalización

Las pruebas de cristalización a escala nanolitros se realizaron utilizando un robot *Nanodrop Innovadyne* (Innovadyne Technologies, Estados Unidos). Los experimentos de análisis se llevaron a cabo a 18 °C utilizando una pantalla de matriz dispersa (Newman et al, 2005), mientras que los experimentos de cristalización se realizaron mediante el método de la gota colgante en una placa de 96 pocillos *Innovaplate SD-2* (IDEX Corporation) con un reservorio que contenía 65 µL de solución precipitante. Cada gota estaba formada por 250 nL de solución proteica (9-10 mg/mL) en tampón Tris-HCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,0 con NaCl 100 mM) y el mismo volumen de solución de reservorio.

Después de tres días se formaron pequeños cristales en muchas de las condiciones probadas y estas se escalaron a volúmenes de microlitros en placas VDX de gota colgante de 24 pocillos (Hampton Research). Se optimizaron las condiciones de cristalización variando la concentración de precipitante, la composición del tampón, el pH y la relación proteína:precipitante para obtener cristales óptimos con los que realizar los experimentos de difracción. Después de analizar todas las variables, los mejores cristales fueron los preparados en nitrato sódico 3M, acetato sódico trihidrato 0,1 M pH 4,6 (1  $\mu$ L de solución proteica y 2  $\mu$ L de solución del reservorio). En estas condiciones los cristales crecieron en dos días.

## 17.2. Difracción de rayos X

Los cristales preparados en nitrato sódico 3M, acetato sódico trihidrato 0,1 M pH 4,6 se recogieron y sumergieron varios segundos en una solución crioprotectora constituida por solución de reservorio con 10 % (v/v) de 2-metil-2,4-pentanodiol. Inmediatamente después se introdujeron los mismos en nitrógeno líquido y se utilizaron para difracción de rayos X a -173 °C utilizando radiación de sincrotrón. Los datos de difracción se obtuvieron en dos líneas de luz: ID23-2 ( $\lambda = 0,873$  Å; detector *MarmOSAIC* 225 mm) e ID29 ( $\lambda = 0,979$  Å; detector *Pilatus 6M*) en el *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Francia). Los datos de difracción consistentes en 180 (ID23-2; ángulo de oscilación,  $\Delta\Phi = 1^\circ$ ) y 1800 (ID29; ángulo de oscilación,  $\Delta\Phi = 0.1^\circ$ ) marcos se procesaron con *XDS* (Kabsch, 2010). Las intensidades *hkl* obtenidas se introdujeron en el programa *CCP4* (Winn et al, 2011) para el examen del grupo espacial con *POINTLESS* y escalado y reducción de la intensidad con *SCALA* (Evans, 2006; Winn et al, 2011). El análisis de la calidad de los datos y el hermanamiento merohedral se realizó con varios programas: *TRUNCATE* (French et al, 1978; Winn et al, 2011), *phenix-xtriage* (Adams et al, 2010), *L-test* (Adams et al, 2010; Padilla et al, 2003) y *H-test* (Lebedev et al, 2006).

La estructura de *BpNDT* se determinó mediante reemplazo molecular con PHASER (Mccoy et al, 2007), utilizándose como modelo las coordenadas atómicas de la purina 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus helveticus* (PDB 1s2d; 29 % de identidad de secuencia aminoacídica) (Anand et al, 2004).

## 18. Mutagénesis dirigida de residuos del centro activo de *Bp*NDT

Se llevaron a cabo mutaciones sobre 7 aminoácidos distintos:

Y5F, Y5H, Q40E, Q40K, D59N, D59H, D79N, D79H, E85D, E85Q, E85H, N107D, N107H, K142Y, K142G y  $\Delta$ K142.

El DNA molde sobre el que se introdujeron las mutaciones fue el plásmido recombinante pET28a(+)-*Bpndt-6his* (Tabla 3) que contiene el gen *Bpndt-6his*. Para ello se empleó el *Quickchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Estados Unidos) y los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el programa web Quikchange Primer Design (Agilent Technologies, Estados Unidos). En primer lugar se llevó a cabo la PCR siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 6, y el plásmido amplificado se incubó durante 2 h con 1 U de la enzima de restricción *DpnI*. A continuación se transformaron células ultracompetentes XL10-Gold siguiendo el protocolo del apartado 8 y, una vez se comprobó mediante secuenciación que se había introducido la mutación deseada, se expresaron las diversas construcciones en *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo el protocolo de los apartados 8.1 y 9.1 de Materiales y Métodos.

**Tabla 6.** Programa de amplificación por PCR.

<b>Amplificación pET28a(+)-<i>Bpndt-6his</i></b>
1. Desnaturalización 30 s, 95 °C
2. Desnaturalización 30 s, 95 °C
3. Hibridación 1 min, 55 °C
3. Extensión 6 min, 68 °C

A continuación se procedió a la purificación de las proteínas mutadas mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni-agarosa (apartado 9.3 de Materiales y Métodos).

Una vez purificadas, se determinó la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de los mutantes *Bp*NDT-His mediante el análisis de la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de dUrd y Ade siguiendo las condiciones descritas en el apartado 10.2.

## 19. Inmovilización de *Bp*NDT

La inmovilización de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Marco Terreni en la Universidad de Pavia (Italia), a través de distintas técnicas de inmovilización.

### 19.1. Inmovilización covalente

En primer lugar se abordó la inmovilización de la *Bp*NDT sobre glioxil agarosa. Para ello se activó la agarosa, sefarosa CL-6B, siguiendo el protocolo descrito por Guisán (Guisán, 1988):

5 g de sefarosa CL-6B se resuspendieron en 1,4 mL de agua destilada en baño de hielo bajo agitación mecánica. A continuación se añadieron, en primer lugar, 2,4 mL de NaOH 1,7 M que contenía 68,4 mg de NaBH<sub>4</sub>, y en segundo, 4,8 mL de glicidol 2 M. Se incubó bajo agitación mecánica a temperatura ambiente durante 18 h. Se lavó la agarosa con agua destilada y se oxidó mediante su incubación con 34 mL de NaIO<sub>4</sub> 100 mM durante 2 h a temperatura ambiente bajo agitación. Finalmente se lavó abundantemente con agua destilada y se almacenó a 4 °C en seco.

Para inmovilizar *Bp*NDT sobre el soporte activado, se añadieron 0,5 g de glioxil agarosa a 7,1 mL de carbonato potásico 100 mM pH 10,0 que contenía 0,25 mg de *Bp*NDT (4,7 IU) y se agitó a temperatura ambiente o 4 °C durante 3 h (en algunos casos se añadió dUrd 5 mM). Para reducir el enlace formado se añadieron 7,1 mg de NaBH<sub>4</sub> y, después de incubar 30 min, se lavó el derivado inmovilizado con fosfato potásico 50 mM pH 4,5 y agua destilada (Guisán, 1988). El derivado inmovilizado se mantuvo a 4 °C en tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,0 con glicerol 20 %.

### 19.2. Inmovilización por interacción iónica

Para llevar a cabo la inmovilización mediante interacción iónica se activaron los soportes empleados, agarosa y Sepabeads EC-EP, con polietilenimina (PEI).

El protocolo de activación de agarosa con PEI empleado fue el siguiente: 1,3 g de PEI (MM 600 Da) se disolvieron en 12,6 mL de una disolución de NaCl 1 M pH 10,0. Se añadió 1 g de glioxil agarosa a la solución anterior y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente en agitación. Se añadieron 57 mg de NaBH<sub>4</sub> y la solución se incubó del mismo modo 2 h. Para finalizar, la agarosa activada se lavó con acetato sódico pH 4,0 y agua destilada. Se mantuvo a 4 °C hasta su utilización.

La activación de Sepabeads EC-EP con polietilenimina consistió en añadir 25 g de Sepabeads EC-EP a una solución de PEI (MM 600 Da) en NaCl 1 M pH 11,0 e incubar bajo agitación mecánica durante 24 h. El soporte se filtró y lavó con la solución de NaCl y agua destilada. Se guardó a 4 °C.

El proceso de inmovilización sobre ambos soportes consistió en resuspender 0,5 g de soporte activado en 7 mL de tampón fosfato potásico 5 mM pH 7,5 que contenía 0,25 mg de *Bp*NDT (4,7 IU) e incubar con agitación mecánica durante 1 h a temperatura ambiente. En los casos en los que no se llevó a cabo el entrecruzamiento, el derivado se almacenó a 4 °C en seco.

#### **19.2.1. Entrecruzamiento con dextrano aldehídico**

La formación de grupos aldehído en el dextrano (MM 20000 / 100000 Da) se consiguió mediante oxidación con  $\text{NaIO}_4$ . Para ello, 1,67 g de dextrano se resuspendieron en 50 mL de agua destilada y se añadieron distintas cantidades de  $\text{NaIO}_4$  dependiendo del porcentaje de oxidación deseado (Guisán et al, 1996). La solución se agitó a temperatura ambiente 2 h y se dializó en agua durante 20 h.

Para entrecruzar *Bp*NDT inmovilizada previamente sobre un soporte activado con PEI, se añadió el dextrano oxidado (10 % v/v) a la suspensión en la que se llevó a cabo la inmovilización, y después de agitar 1 h el pH se ajustó a 10,0 y se añadió  $\text{NaBH}_4$  (1 mg/mL suspensión). Después de 30 min, se lavó la *Bp*NDT inmovilizada y entrecruzada con dextrano con tampón fosfato potásico 50 mM pH 4,5 y agua destilada.

#### **19.3. Ensayo de actividad de *Bp*NDT inmovilizada**

Al igual que en el caso de *Bp*NDT libre, se definió como reacción estándar la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina y adenina.

Cuando la carga del derivado fue 0,5 mg enzima/g soporte, se añadieron 25 mg de *Bp*NDT inmovilizada a 1 mL de dUrd y Ade 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8,0 y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos bajo agitación. Se cogieron alícuotas a distintos tiempos empleando una pipeta con un filtro acoplado a la punta y 50 µL del sobrenadante obtenido se diluyeron a la mitad y se analizaron mediante HPLC según las condiciones descritas en el apartado 10 de Materiales y Métodos.

Cuando la carga del biocatalizador fue 2 mg enzima/g soporte, se emplearon las mismas condiciones pero se redujo el tiempo de reacción a 5 min.



#### 19.4. Estudios de estabilidad de *Bp*NDT inmovilizada

Se incubaron 300 mg de *Bp*NDT inmovilizada en 2 mL de tampón carbonato potásico 100 mM pH 10,0 o tampón HEPES 50 mM pH 8,0 con 20 % de dimetilformamida (DMF) durante 48 h a 25 °C en agitación. Se tomaron alícuotas de 200 µL a distintos tiempos, el derivado se filtró y lavó con HEPES 50 mM pH 8,0 y su actividad se determinó mediante el ensayo estándar anteriormente descrito.

#### 19.5. Reutilización del biocatalizador inmovilizado

Se añadieron 200 mg de *Bp*NDT inmovilizada a 8 mL de una disolución de dUrd y Ade 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8,0 y se incubaron durante 5 min a 37 °C, 250 r.p.m. La mezcla de reacción se filtró y una alícuota de sobrenadante se diluyó a la mitad con agua destilada para la cuantificación de los productos de reacción mediante análisis por HPLC. La enzima inmovilizada se lavó con agua destilada y con el tampón de reacción y se determinó su peso antes de comenzar otro ciclo catalítico.

#### 19.6. Efecto de la temperatura sobre el derivado inmovilizado

El efecto de la temperatura sobre la actividad del biocatalizador inmovilizado se determinó al llevar a cabo el ensayo de actividad de síntesis de dAdo al incubar 15 mg de *Bp*NDT inmovilizada con dUrd y Ade 10 mM entre 4 °C y 80 °C durante 5 minutos (apartado 19.3). Se calculó la energía de activación de la enzima inmovilizada a través de la ecuación de Arrhenius, ecuación [3] (apartado 12).

Los estudios de termoinactivación se llevaron a cabo mediante incubación de 300 mg de derivado en tampón HEPES 50 mM pH 8,0 durante 168 h a 40, 50 y 60 °C. Se cogieron alícuotas a distintos tiempos, se filtraron y se pesó el derivado. Se ensayó la síntesis de dAdo a partir de dCyd y Ade en condiciones estándar (apartado 19.3). Los datos de inactivación térmica se ajustaron de acuerdo al modelo que propone la existencia de tres estados enzimáticos ( $E$ ,  $E_1$  y  $E_2$ ), siendo  $k_1$  y  $k_2$  los coeficientes de desactivación de primer orden y  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  la relación de las actividades específicas  $E_1/E$  y  $E_2/E$  respectivamente. Los datos experimentales correspondientes a las tres temperaturas se ajustaron a un decaimiento exponencial doble, ecuación [8] (Henley et al, 1985).

$$A = \alpha_2 + \left[ 100 + \frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1} \right] e^{-k_1 t} + \left[ \frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1} \right] e^{-k_2 t} \quad [8]$$

### **19.7. Síntesis de nucleósidos no naturales de interés terapéutico**

Se sintetizaron dos análogos de nucleósidos, 5-trifluorotimidina, 5-aza-2'-desoxicitidina y 5-aza-2'-desoxiuridina, en tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,5 empleando *Bp*NDT inmovilizada en un volumen de reacción de 5 mL. Cuando la concentración de sustratos empleada fue 1 mM, se utilizaron 19 mg de derivado (0,34 UI en la reacción estándar) para llevar a cabo la reacción a 37 °C durante 5 min. Cuando las concentraciones de sustratos empleadas fueron 2-30 mM, se utilizaron 95 mg de biocatalizador (1,7 UI en la reacción estándar) y se incubaron a 37 °C durante 2-6 h. Las reacciones se pararon mediante filtrado del derivado y la formación de producto se analizó mediante HPLC. El tiempo de retención de estos sustratos y sus correspondientes productos se encuentra detallado en el apartado 15 de Materiales y Métodos.



## **IV. RESULTADOS**

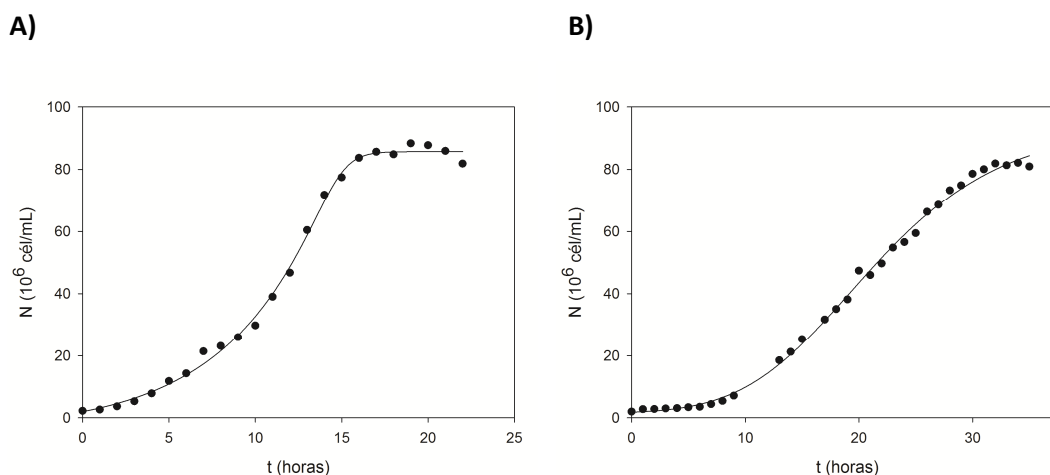


## 1. Aislamiento y purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074

Con el fin de caracterizar la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se abordó su purificación a partir del microorganismo productor. Para ello, antes de la purificación, se procedió a determinar las condiciones óptimas de crecimiento de *B. psychrosaccharolyticus* y la actividad DRT de sus células.

### 1.1. Estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074

Para determinar la temperatura óptima de crecimiento de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se analizó el crecimiento del microorganismo en medio de cultivo líquido *Nutrient Broth* a 20 y 28 °C. A partir del valor de densidad óptica a 600 nm de diluciones de cultivo tomadas a distintos tiempos, se determinó el valor de N (millones de células en 1 mL de medio de cultivo) a cada hora mediante el ajuste de los datos a la ecuación [1] descrita en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos.



**Figura 22.** Curvas de crecimiento de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074. **A)** 28 °C, **B)** 20 °C.  $5,77 \times 10^{-4} \leq \sigma \leq 9,26 \times 10^{-2}$ .

*Bacillus psychrosaccharolyticus* es capaz de crecer a 20 °C y 28 °C, observándose que mientras la fase de latencia de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 a 28 °C es de 5 h, a 20 °C se incrementa hasta 9 h. Además, la fase exponencial a 20 °C es mucho mayor que a 28 °C,

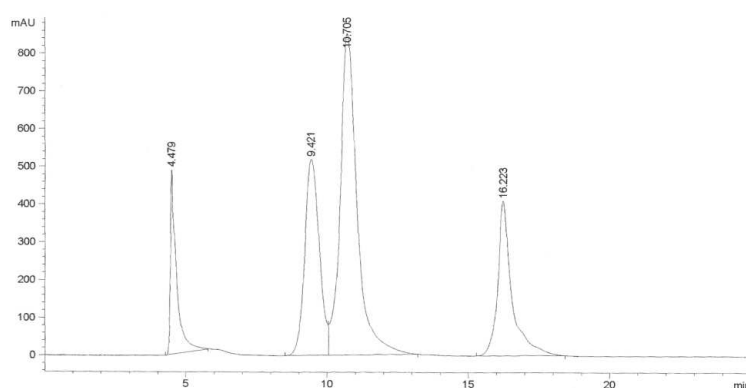
necesitando el doble de tiempo (30 h de incubación) para alcanzar la fase estacionaria (Figura 22).

A la vista de los resultados de crecimiento obtenidos, aunque *B. psychrosaccharolyticus* ha sido descrito como microorganismo psicrófilo, sería más correcto clasificarlo como microorganismo psicrotolerante, ya que el tiempo de generación, calculado a través de la representación semilogarítmica (Madigan et al, 2012), es 7 h a 20 °C y 3 h a 28 °C, indicando que su temperatura óptima de crecimiento es 28 °C.

Para abordar la purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus*, puesto que se trata de una enzima intracelular, se fijó la temperatura de crecimiento a 28 °C, ya que se obtiene mayor número de células en menor tiempo.

### 1.2. Determinación de la actividad 2'-desoxirribosiltransferasa en células de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074

Fernández-Lucas y colaboradores determinaron que las células de *Bacillus psychrosaccharolyticus* son capaces de transferir la 2'-desoxirribosa entre 2'-desoxiuridina (dUrd) o timidina (Thd) y adenina (Ade) 5 mM para producir 2'-desoxiadenosina (dAdo) después de 1 h de incubación a 57 °C (Fernández-Lucas et al, 2007).



**Figura 23.** Cromatograma en el que se observan los 4 picos correspondientes al uracilo (4,5 min), 2'-desoxiuridina (9,4 min), adenina (10,7 min) y 2'-desoxiadenosina (16,2 min).

Para comprobar que *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 presenta actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa se determinó la síntesis de dAdo a partir de dUrd y Ade. Para ello, después de crecer las células del microorganismo a 28 °C durante 18 h y tras centrifugar y eliminar el sobrenadante, las células se incubaron 1 h a 57 °C (apartado 10.1 de Materiales y Métodos). Como se puede observar en el cromatograma (Figura 23) se alcanzó un 27 % de conversión a 2'-desoxiadenosina, por lo que se procedió a la purificación y caracterización de la enzima.

### **1.3. Purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074**

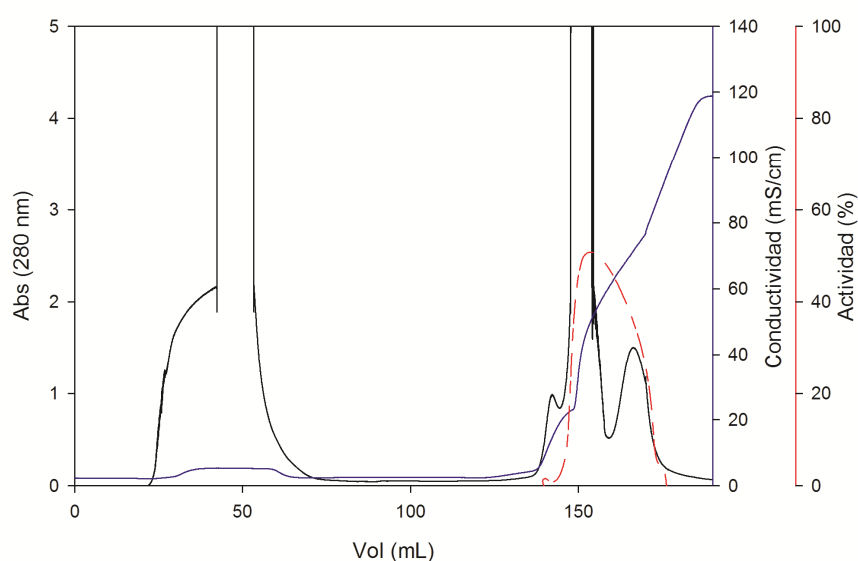
Con el fin de abordar la purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 (*Bp*NDT) se crecieron las células del microorganismo en medio *Nutrient Broth*, se centrifugaron y lisaron siguiendo las condiciones descritas en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. La purificación de *Bp*NDT se llevó a cabo mediante tres pasos cromatográficos:

#### **Cromatografía de intercambio aniónico**

En primer lugar se determinó el signo de la carga neta de *Bp*NDT mediante pruebas en discontinuo de unión de la proteína en tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,0 a dos resinas con cargas distintas, Q-Sepharose (intercambiador aniónico) y CM-Sepharose (intercambiador catiónico). *Bp*NDT a pH 7 queda retenida en Q-Sepharose, mientras que eluye cuando el intercambiador es CM-Sepharose, lo que indica que *Bp*NDT presenta carga neta negativa a pH 7, por lo que su purificación se abordó mediante el intercambiador aniónico con grupos R<sub>2</sub>-NH<sup>+</sup>, *Bio-scale Mini UNO-sphere Q cartridge* (Bio-Rad, Estados Unidos).

El extracto celular obtenido tras lisar las células de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se aplicó en la columna *Bio-scale Mini UNO-sphere Q cartridge* a flujo 0,5 mL/min y se procedió a la elución de *Bp*NDT siguiendo las condiciones descritas en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. La presencia de *Bp*NDT se determinó mediante ensayo de actividad estándar en tampón MES 50 mM pH 6,5 utilizando desoxiuridina y adenina como sustratos. Como se puede observar en la figura 24, la elución de *Bp*NDT no se produce hasta que no se aplica un tampón con alta fuerza iónica.



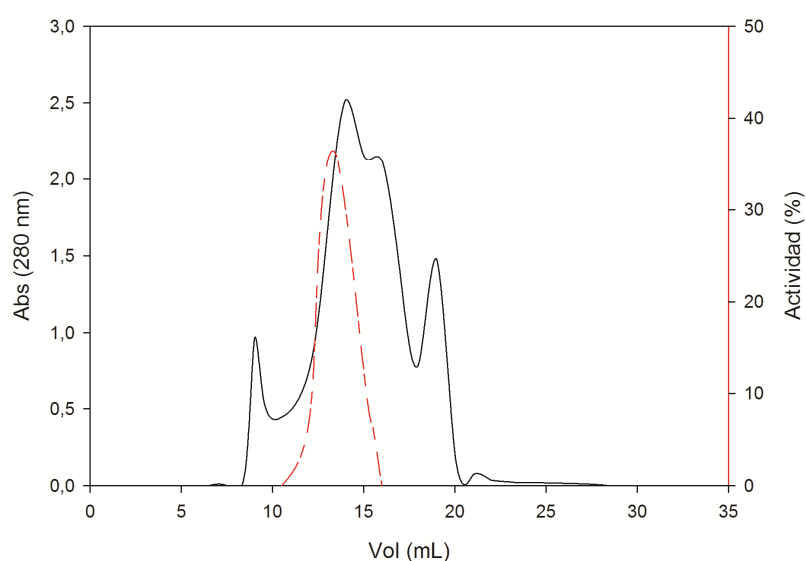


**Figura 24.** Perfil de elución de la cromatografía de intercambio aniónico *Bio-scale Mini UNO-sphere Q cartridge*. En negro se representa el perfil de absorbancia de las proteínas eluidas, en azul la conductividad de la muestra y en rojo la actividad de *BpNDT*.

La conductividad de la muestra se relaciona con la fuerza iónica, de modo que antes de aplicar el gradiente de NaCl eluyeron un gran número de proteínas con carga positiva, y una vez comenzó a aumentar la concentración de NaCl empezaron a eluir las proteínas retenidas en la columna en las condiciones iniciales. Las fracciones en las que se detectó actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa se juntaron y concentraron en lecho de PEG-35000 para llevar a cabo el segundo paso de la purificación.

### Cromatografía de exclusión molecular

Las proteínas contenidas en las fracciones seleccionadas se aplicaron en una columna *Superosa 12 10/300 GL* (GE Healthcare, Estados Unidos) equilibrada en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0 a flujo 0,5 mL/min (apartado 9.2 de Materiales y Métodos).



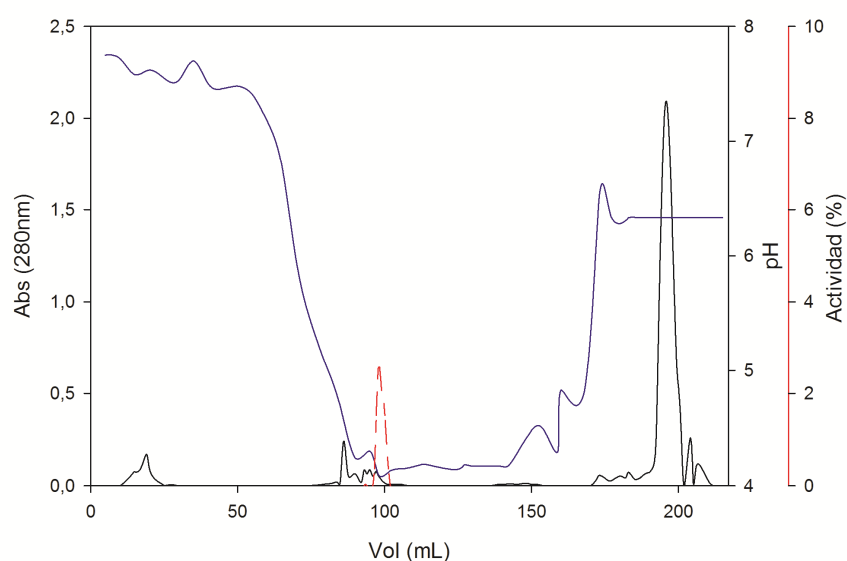
**Figura 25.** Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular en columna *Superosa 12 10/300 GL*. En negro se representa el perfil de absorbancia de las proteínas eluidas y en rojo la actividad de *BpNDT*.

El ensayo de actividad de las diferentes fracciones puso de manifiesto la presencia de *BpNDT* en el volumen de elución 12-16 mL (Figura 25). Las fracciones en las que se detectó la presencia de *BpNDT* se juntaron y dializaron para llevar a cabo el último paso de la purificación.

### Cromatografía de isoenfoque

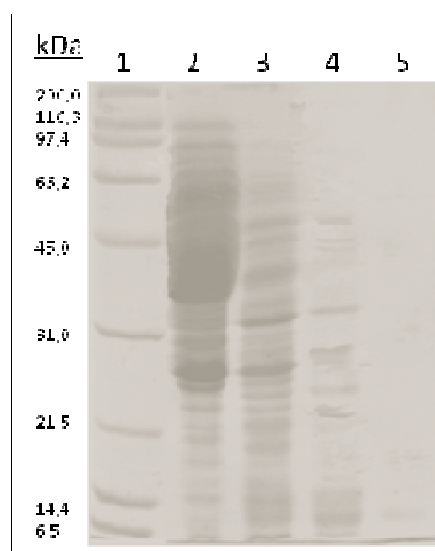
Las proteínas restantes presentes en la muestra se separaron según su punto isoeléctrico (pI), para lo que se utilizó una columna *Mono P 5/200 GL* (GE Healthcare, Estados Unidos) equilibrada en tampón imidazol 25 mM, pH 7,4. La muestra se cargó a flujo 1 mL/min y se eluyó empleando el tampón comercial *Polybuffer 74*, pH 4,0 (apartado 9.2 de Materiales y Métodos).

Como se puede observar en la Figura 26, la absorbancia a 280 nm de las fracciones en las que se detectó actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa es muy baja; la cantidad de proteína es mínima.



**Figura 26.** Perfil de elución del isocromatoenfoque en columna *Mono P 5/200 GL*. En negro se representa el perfil de absorbancia de las proteínas eluídas, en azul la variación de pH y en rojo la actividad de *BpNDT*.

La pureza de la muestra en los distintos pasos cromatográficos se analizó mediante electroforesis PAGE-SDS (Figura 27).



**Figura 27.** PAGE-SDS en geles de poliacrilamida 12,5 % de los distintos pasos de purificación de *BpNDT*. 1- Marcadores de masa molecular *Broad Range* (Bio-Rad, Estados Unidos), 2- Extracto celular después de la sonicación, 3- *BpNDT* después de la cromatografía de intercambio iónico, 4- *BpNDT* después de la exclusión molecular, 5- *BpNDT* después del cromatoenfoque.

La nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 no se aprecia en los geles de poliacrilamida por la baja cantidad presente en este microorganismo, ya que debería presentar una masa molecular de aproximadamente 20 kDa, en base a las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas ya descritas, que se sitúan entre 16 kDa de *Desulfotalea psychrophila* (Alfaro-Ureña, 2012) y 25,5 kDa de *Lactococcus lactis* (Miyamoto et al, 2007). A partir de la relación entre el volumen de elución y la masa molecular de las 4 proteínas de masa molecular conocida (apartado 9.2 de Materiales y Métodos), se determinó que la masa molecular aproximada de *Bp*NDT es 116 kDa, concordante con una masa molecular monomérica de 19-20 kDa si se presupone que *Bp*NDT es hexamérica como sus homólogas *Lr*NDT o *L*/NDT (Cook et al, 1990; Fernández-Lucas et al, 2010).

La baja cantidad de proteína obtenida hace que no sea factible abordar la caracterización de la enzima a partir del microorganismo productor, *Bacillus psychrosaccharolyticus*. Por ello, se procedió a abordar su obtención mediante otra estrategia.

Por otra parte, con la enzima pura se llevó a cabo el análisis de la actividad 2'-desoxirribosiltransferasa sobre distintos nucleósidos y bases con el fin de determinar el tipo de enzima (Tabla 7). Como se puede observar, *Bp*NDT lleva a cabo la transferencia únicamente del grupo 2'-desoxirribósido de forma independiente del tipo de base, es una nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de tipo II (Holguin et al, 1975a).

**Tabla 7.** Actividad de *Bp*NDT sobre distintos sustratos.

dUrd + Ade	Ino + Ade	Urd + Ade	dUrd + Thy
+	-	-	+

Condiciones de reacción: 0,20 µg de enzima se incubaron 10 min a 40 °C con 40 µl de sustratos 10 mM en tampón MES 50 mM pH 6,5 o fosfato potásico 50 mM pH 7,0.

## **2. Aislamiento, clonación y expresión del gen *ndt* de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074**

Para poder disponer de suficiente cantidad de enzima se procedió a abordar su producción mediante la clonación del gen *ndt* que codifica la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074.

### **2.1. Identificación y expresión del gen *ndt* a partir de una genoteca de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074**

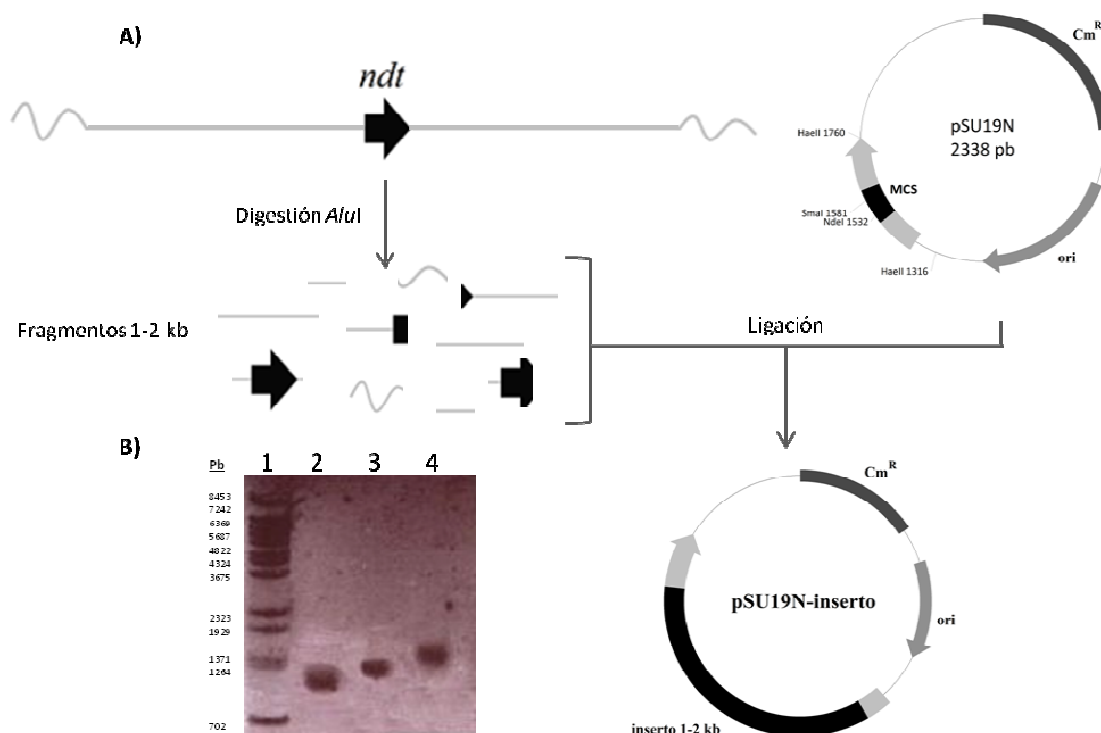
Para identificar y expresar el gen *ndt* se abordó, en colaboración con el Dr. Kaminski del Instituto Pasteur de París, una estrategia basada en el cribado funcional de una genoteca de *Bacillus psychrosaccharolyticus*, utilizando la cepa *E. coli* PAK6, auxótrofa para guanina (Kaminski, 2002), y el plásmido pSU19N (Tabla 3).

#### **2.1.1. Construcción de una genoteca de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 y cribado funcional empleando *E. coli* PAK6**

El banco de DNA genómico de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 en el vector pSU19N se construyó mediante digestión parcial del DNA del microorganismo con la enzima *AluI* y purificación de los fragmentos de 1, 1,5 y 2 Kb (Figura 28), como se describió en el apartado 5 de Materiales y Métodos.

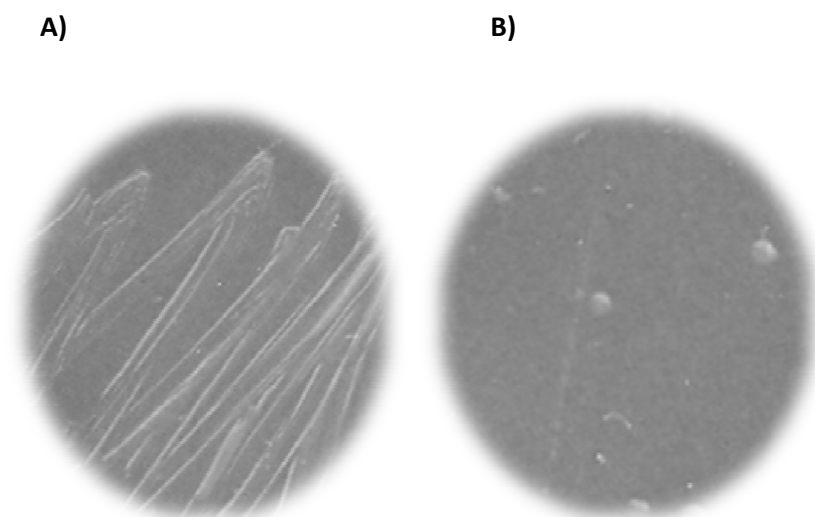
Las mezclas de ligación de pSU19N con los distintos fragmentos se emplearon para transformar *E. coli* PAK6. Las células recombinantes se sembraron en medio mínimo suplementado con dGua y Ade (apartado 5.1 de Materiales y Métodos) para llevar a cabo el cribado funcional según su capacidad de producción de guanina. *E. coli* PAK6 presenta delecionados los dos genes del operón *guaBA*, que codifican la IMP deshidrogenasa y la GMP sintetasa, y catalizan, respectivamente, la conversión de IMP a xantosina 5'-fosfato y de esta a GMP. Los genes del operón *deoCABD* también se encuentran delecionados, operón implicado en el catabolismo de nucleósidos para formar gliceraldehído-3-fosfato (Figura 5). De este modo, el GMP, necesario para la supervivencia de *E. coli* PAK6, sólo puede ser sintetizado a partir de la guanina mediante la guanina fosforribosiltransferasa (gen *gpt*), es decir, *E. coli* PAK6 es una cepa auxótrofa para guanina. Por tanto, dGua sólo es fuente de guanina cuando se expresa la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa en PAK6, sólo pueden crecer aquellas colonias que hayan incorporado un fragmento en el que se encuentre el gen *ndt* de

*Bacillus psychrosaccharolyticus* completo y que por tanto puedan llevar a cabo la transferencia de la desoxirribosa entre dGua y Ade.



**Figura 28. A)** Representación esquemática de la construcción de la genoteca de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 en el vector pSU19N. Las abreviaturas indicadas en el esquema son:  $Cm^R$  (gen que confiere resistencia a cloranfenicol), *ori* (origen de replicación), MCS (*Multiple Cloning Site*). **B)** Gel de agarosa 0,8 % con los fragmentos de 1, 1,5 y 2 Kb de DNA genómico de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074. 1- Marcadores *Lambda DNA/Eco91I* (*BstEII*) (Fermentas, Alemania), 2- fragmento de 1 Kb, 3- fragmento de 1,5 Kb, 4- fragmento de 2 Kb.

El control, *E. coli* PAK6-pSU19N, en presencia de dGua y Ade, sólo presentó crecimiento residual (Figura 29 B), que podría ser debido a la actividad de la xantosina fosforilasa (codificada por el gen *xapA*), enzima que puede llevar a cabo la fosforólisis y la síntesis de desoxi- y ribonucleósidos púricos.



**Figura 29.** Crecimiento en medio sólido M9 suplementado con Cm (30 µg/mL), dGua y Ade 0,3 mM, IPTG 1 mM **A)** *E. coli* PAK 6 transformado con pSU19N que contiene un fragmento de DNA de *B. psychrosaccharolyticus* de 1,5 Kb **B)** control, *E. coli* PAK 6 transformado con pSU19N.

Una de las colonias aisladas presentó crecimiento en placa superior al crecimiento residual del control (Figura 29), por lo que se procedió a la purificación del DNA plasmídico y a la secuenciación del fragmento de DNA de *B. psychrosaccharolyticus* (1,5 Kb) introducido en pSU19N empleando para ello los oligonucleótidos RP23 y FP23 (Tabla 4).

Dentro del fragmento de 1,5 Kb se localizó un marco de lectura abierto (ORF) de 444 pb, con 30,4 % de contenido GC, que codifica 148 aminoácidos (Figura 30).

Esta secuencia se analizó mediante Blast-P, detectándose un dominio conservado indicativo de la pertenencia a la superfamilia glicosiltransferasa (EC 2.4.), dentro de la cual se encuentran las pentosiltransferasas (EC 2.4.2.), y por tanto las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas (EC 2.4.2.6). Además, la secuencia presenta 48 % de identidad con proteínas descritas como glicosiltransferasas.

De acuerdo con la base de datos *Conserved Domains Database* (CDD), las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de grupos azúcar entre moléculas donadoras activadas y moléculasceptoras específicas, formando enlaces glicosídicos. La molécula aceptora puede ser un lípido, una proteína, un compuesto heterocíclico o un carbohidrato; y la molécula a transferir puede ser el azúcar de UDP, ADP, GDP o CMP, lo que refleja el amplio rango de actividades biológicas que presenta esta familia (Marchler-Bauer et al, 2013) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

atg atg gat ttg aaa tta ttt aca ttt aaa ttc gca gga tcc tat gat	48
M M D L K L F T F K F A G S Y D	16
gaa aat agt aaa tac tat aaa gac ttt aga gat ata tgt aca ttt gtg	96
E N S K Y Y K D F R D I C T F V	32
ggg cat gtg aca aaa gaa gaa att att aat tta tat agg gaa tct gat	144
G H V T K E E I I N L Y R E S D	48
ata ctc gta ttc cct tct tta gca gat gga ttt ggg tta tca gtt tta	192
I L V F P S L A D G F G L S V L	64
gaa gca cta tca ttc ggt att ccc gta att tgt tct gat aat gct ggt	240
E A L S F G I P V I C S D N A G	80
gca agt gat cta atc att aat ggc tac aat ggc tac gtt gtt tca aca	288
A S D L I I N G Y N G Y V V S T	96
ggg gtg gag agc gag ata tat gat aaa tta att tgg ttt aat aat aat	336
G V E S E I Y D K L I W F N N N	112
aga gat aaa ttg caa gag atg agt ata aat gca cga aag agt gca gct	384
R D K L Q E M S I N A R K S A A	128
gaa cta act tgg gag aag tat aat caa aat gta aaa aat gca att aaa	432
E L T W E K Y N Q N V K N A I K	144
aaa ata atg gaa taa	447
K I M E -	148

**Figura 30.** Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del marco de lectura abierto (ORF) contenido en el fragmento de DNA (1,5 Kb) clonado en pSU19N.

Además, el análisis del alineamiento de la secuencia aminoacídica con las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas descritas, de las que se conocen los residuos que forman parte del centro activo, con esta secuencia permitieron identificar los residuos que podrían estar implicados en la catálisis, aunque no se observan ni la Gln (Gln<sup>46</sup> en *L/NDT*) ni la Tyr terminal (Figura 31).



LfNDT	--MKNTDPVAN-TKIYLATSFNFEEQRARIPQALAQLEANPTVGVV--HQPFDFQYKDAR	55
LhPDT	--MKAVVPTG--KIYLGSPFYSDAQREAAKAKELLAKNPSIAHV--FFPFDDGFTDPD	53
LrNDT	-----MINQKS-KTVYFCAGWFTDKQNKAYEDAMNAIKANPTVDVENSIVPLQHQYKGLR	54
LlNDT	-----MP-K--KTIYFGAGWFTDRQNKAYKEAMEALKENPTIDL ENSYVPLDNQYKGIR	51
hBpNDT	-MDLKLFTFKF-AGSYDENSKYYKDFRDICTFVGHVTKEEIINLYRES DILVFPS---LA	55
LfNDT	VSDPAGVFGSL--EWQIATYNNDLNAVGTSDVCVALYDMDQIDEGICMEIGMFVALHKP	113
LhPDT	EKNPEIGGIRSM--VWRDATYQNDLTGISNATCGVFLYDMDQLDDGSAFELIGFMRAMHKP	111
LrNDT	VDEHPE-LLQDR--EWSTATYNGDRVGVSTSDMLLAVYIPEEEDVGMGVELGMARALGKY	111
LlNDT	VDEHPE-YLHDK--VWATATYNNDLNGIKTNDIMLGVIYPDEEDVGLGMEELGYALSQGY	108
hBpNDT	DGFGLSVLEALSFGIPVI---CSDNAG--ASDLINGYVYST---GVESLIYDKLIWF--	105
LfNDT	IVLLPFTKKDKSAYEANLMLARGVTTWLEPN-DFSPLKDFNF--NHPMAQFPFPFKVF-	168
LhPDT	VILVPFTEHPEKEKKMNLMI AQGVTTIIDGNTEFEKLADYNF---NECPSNPVRGYGIY-	167
LrNDT	IMVVIPDE--DFGKPINLMSWG----IADNFIKMS ELPNYDF---NKPSYN-FYDGGVY-	160
LlNDT	VLLVIPDE--DYGKPINLMSWG----VSDNVIKMSQLKDFNF---NKPRFD-FYEGAVY-	157
hBpNDT	-NNNRDKLQEMS---INARKS-----AAELTWEKYNQNVKNA--IKKIME-----	144

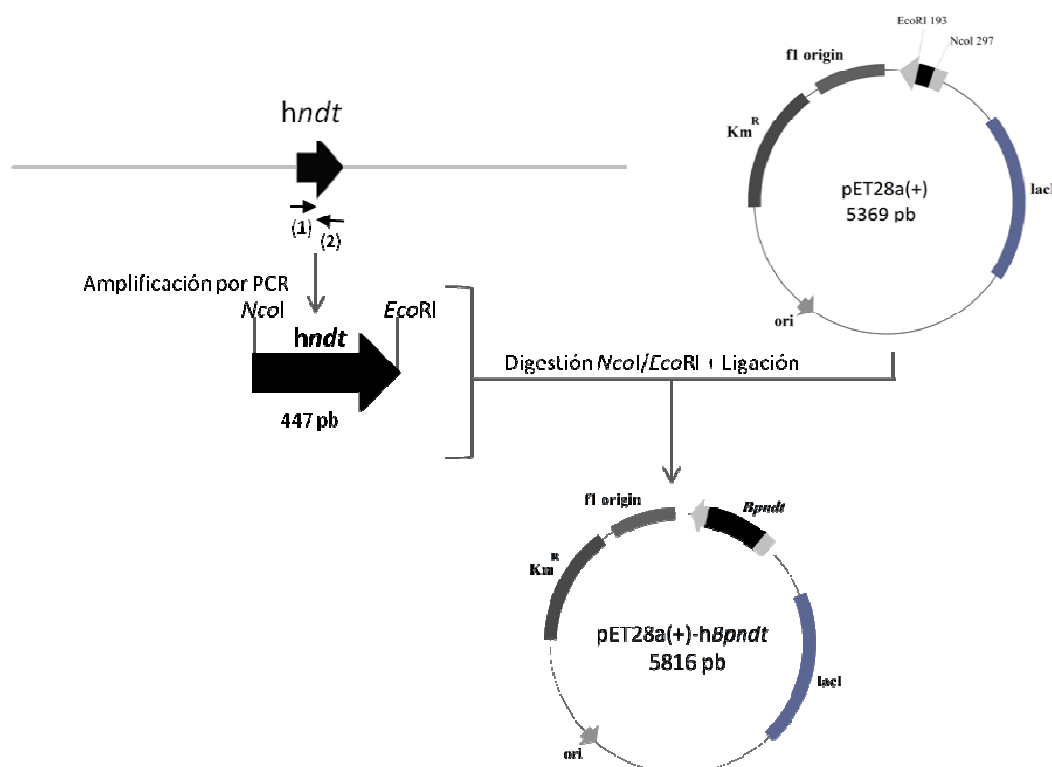
**Figura 31.** Alineamiento con ClustalW de las secuencias de NDTs descritas con la hipotética NDT de *B. psychrosaccharolyticus*. Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas tipo II de *Lactobacillus fermentum* (LfNDT, código acceso GeneBank, gi 52000748), de *Lactobacillus reuteri* (LrNDT, gi 148544199), de *Lactobacillus leichmannii* (LlNDT, gi 9955126), y DRT tipo I de *Lactobacillus helveticus* (LhPDT, gi 47168984). En gris se encuentran marcados los aminoácidos que podrían formar parte del centro activo en base a los ya descritos para LlNDT y LhPDT (Figura 9).

Aunque la definición de glicosiltransferasa es muy amplia, se decidió clonar el gen en *E. coli* BL21 (DE3) para su expresión y, mediante un ensayo de actividad, determinar si realmente el gen codificaba una nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa.

### 2.1.2. Clonación y expresión del hipotético gen *ndt* de *B. psychrosaccharolyticus* (hBpndt) en *E. coli* BL21 (DE3)

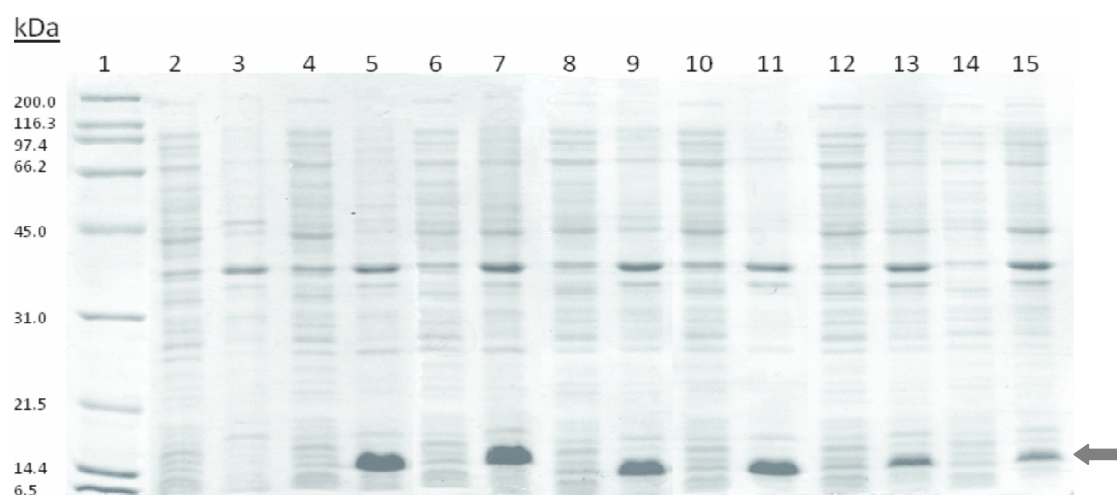
El hipotético gen *ndt* de *B. psychrosaccharolyticus* (hBpndt), aislado e identificado mediante cribado funcional de la genoteca en *E. coli* PAK6 (Figura 30), se clonó en pEt28a(+) y expresó en *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo el protocolo descrito en los apartados 7.1 y 8.1 de Materiales y Métodos. Para ello, el gen hBpndt se clonó en el vector pET28a(+), obteniéndose el plásmido recombinante pET28a(+)-hBpndt (Tabla 3). Este se empleó para transformar células de *E. coli*

BL21 (DE3) obteniéndose la cepa recombinante *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*hBpndt* (Tabla 2) (Figura 32).



**Figura 32.** Representación esquemática de la clonación del gen *hndt* de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 en el vector de expresión pET28a(+). Las abreviaturas indicadas en el esquema son: *Km<sup>R</sup>* (gen que confiere resistencia a kanamicina), *ori* (origen de replicación), *f1 origin* (origen de replicación del bacteriófago f1), *lacI* (inhibidor del operón *lac*); oligonucleótidos: (1) BpNcoI, (2) BpEcoRI (Tabla 4).

Con las células recombinantes *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*hBpndt* se llevaron a cabo estudios de expresión del gen a distintas temperaturas (25 °C, 30 °C y 37 °C) en presencia de diferentes concentraciones de isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) (0,1 mM y 0,5 mM). Después de la ruptura de las células mediante sonicación, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes PAGE-SDS para determinar si la proteína se producía de forma soluble o en cuerpos de inclusión en las distintas condiciones empleadas (Figura 33).



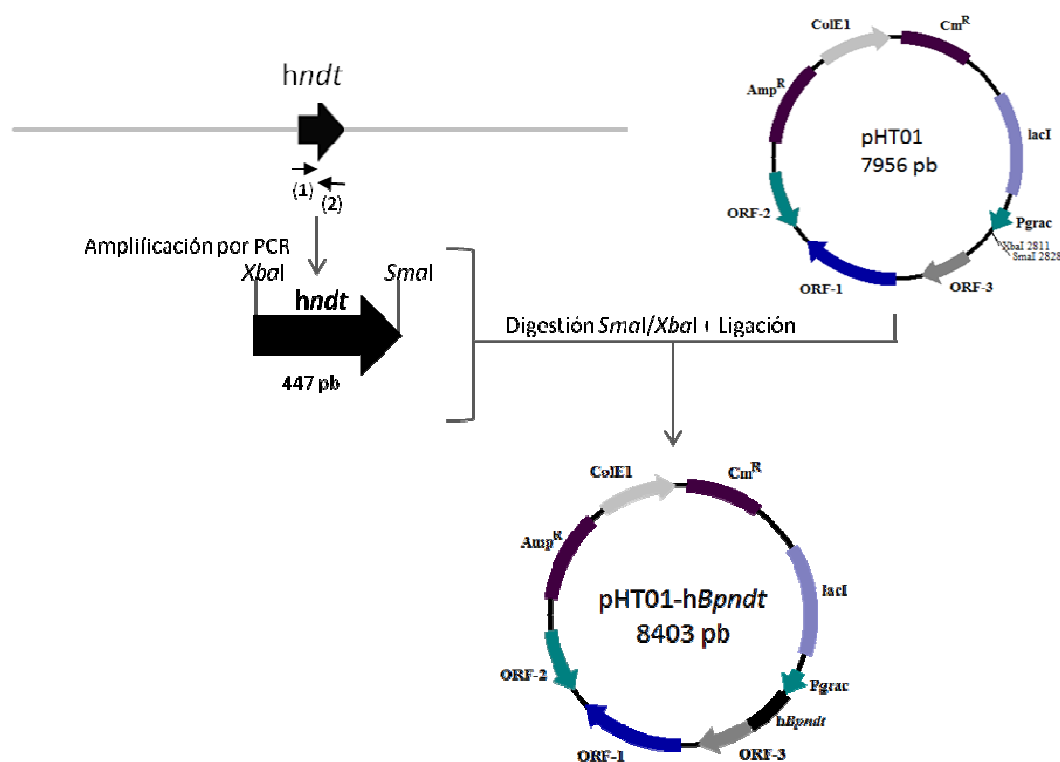
**Figura 33.** PAGE-SDS en geles de poliacrilamida 12,5 % de la expresión de *hBpndt* en células recombinantes *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*hBpndt*. 1- Marcadores de masa molecular *Broad Range* (Bio-Rad, Estados Unidos); 2- Extracto celular control (*E. coli* BL21 (DE3)-pET28a(+)); 3- Precipitado control; 4- Extracto celular del clon recombinante (*E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*hBpndt*) 37 °C, 0,1 mM IPTG; 5- Precipitado del clon 37 °C, 0,1 mM IPTG; 6- Extracto celular del clon 37 °C, 0,5 mM IPTG; 7- Precipitado del clon 37 °C, 0,5 mM IPTG; 8- Extracto celular del clon 30 °C, 0,1 mM IPTG; 9- Precipitado del clon 30 °C, 0,1 mM IPTG; 10- Sobrenadante del clon 30 °C, 0,5 mM IPTG; 11- Precipitado del clon 30 °C, 0,5 mM IPTG; 12- Extracto celular del clon 25 °C, 0,1 mM IPTG; 13- Precipitado del clon 25 °C, 0,1 mM IPTG; 14- Extracto celular del clon 25 °C, 0,5 mM IPTG; 15- Precipitado del clon 25 °C, 0,5 mM IPTG. Flecha- Altura de la banda de interés.

El análisis de la secuencia de aminoácidos mediante el programa ProtParam indica que la masa molecular de la proteína es 16,9 kDa. Como se puede observar en la figura 33, en todos los casos se hiperexpresó una proteína que migra de acuerdo a ese tamaño pero se expresa en forma de cuerpos de inclusión, nunca soluble en el extracto intracelular. Al disminuir la temperatura sólo se consigue reducir la cantidad de proteína expresada, pero no evitar la expresión en forma agregada.

Por este motivo, con ayuda del Laboratorio del Dr. Juan C. Alonso (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC), se procedió a clonar y expresar este gen en células de *Bacillus subtilis*, utilizando el vector pHT01, un vector lanzadera para *E. coli* y *B. subtilis*, con el fin de emplear un sistema más similar al microorganismo de procedencia del gen.

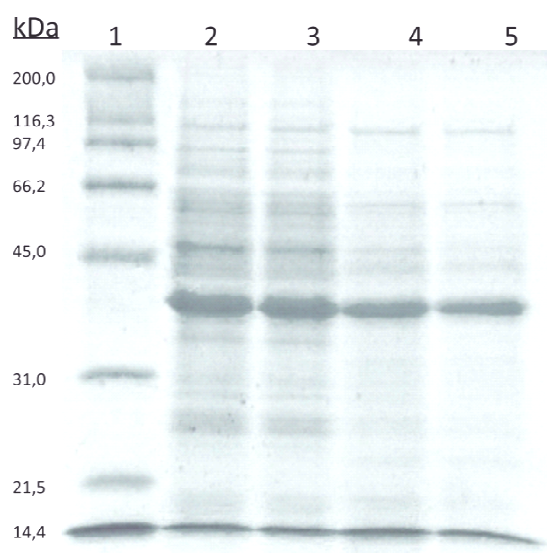
### 2.1.3. Clonación y expresión del gen *hBpndt* en *Bacillus subtilis*

El hipotético gen *ndt* de *B. psychrosaccharolyticus* (*hBpndt*) aislado e identificado mediante cribado funcional de la genoteca en *E. coli* PAK6, fue amplificado mediante PCR utilizando el DNA genómico de *B. psychrosaccharolyticus* como molde y clonado en pHT01, obteniéndose el plásmido recombinante pHT01-*hBpndt* (Tabla 3, apartado 7.2 de Materiales y Métodos) (Figura 34).



**Figura 34.** Representación esquemática de la clonación del gen *hndt* de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 en el vector de expresión pHT01. Las abreviaturas indicadas en el esquema son: *Amp<sup>R</sup>* (gen que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*), *Cm<sup>R</sup>* (gen que confiere resistencia a cloranfenicol en *B. subtilis*), *ColE1* (origen de replicación *ColE1*), *lacI* (inhibidor del operón *lac*), *Pgrac* (promotor *Pgrac*, consistente del promotor *groE*, el operador *lacO* y la secuencia *gsiBSD*); oligonucleótidos: (1) BpXbaIBs, (2) BpSmaIBs (Tabla 4).

Dicha construcción se empleó para transformar células competentes de *B. subtilis* BG214 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8.2 de Materiales y Métodos, obteniéndose el clon recombinante *B. subtilis* BG 214 pHT01-*hBpndt*. Seguidamente, estas células recombinantes se crecieron en medio LB y cuando el cultivo alcanzó una D.O. (600 nm) de 0,6 se indujo con IPTG 0,1 mM y se incubó durante 2 h 30 min a 37 °C, 250 r.p.m.



**Figura 35.** PAGE-SDS en geles de poliacrilamida 12,5 % de la expresión en *B. subtilis* BG214. 1- Marcadores de masa molecular *Broad Range* (Bio-Rad, Estados Unidos); 2- Extracto celular control (*B. subtilis* BG214-pHT01); 3- Precipitado control; 4- Extracto celular del clon recombinante (*B. subtilis* BG214-pHT01-gen); 5- Precipitado del clon recombinante.

Como se puede observar (Figura 35), no hay diferencia en el patrón de bandas entre control y clon recombinante, por lo que no se produjo expresión al inducir con IPTG 0,1 mM.

Aunque se continuó evaluando la genoteca obtenida, no se obtuvieron resultados positivos, por lo que debido a la inviabilidad de obtener esta proteína en forma soluble y a la imposibilidad de obtener un clon que presentase una secuencia con alta identidad con las NDTs descritas, se procedió a secuenciar el genoma del microorganismo productor, *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074.

## **2.2. Identificación, clonación y expresión del gen *ndt* a partir de la secuencia del DNA genómico de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074**

El genoma de un organismo se define como el conjunto de los genes contenidos en el DNA de su cromosoma(s). El genoma bacteriano normalmente se encuentra en una molécula de DNA circular superenrollada, aunque también se puede encontrar en forma de dos o más cromosomas, en forma lineal o en moléculas de DNA extra, denominadas plásmidos. La mayoría de los genomas bacterianos tienen menos de 5 Mbp, y, por norma general, las especies autosuficientes tienen genomas de mayor tamaño que las parasitarias y los de estas a su vez son más grandes que los de patógenos obligados. Además, la composición nucleotídica de los genomas bacterianos varía en gran medida entre especies. El contenido en GC (guanina-citosina) puede variar localmente dentro de un mismo genoma, pero es relativamente

constante dentro de un mismo género o especie bacteriana, variando desde el 25 % de *Mycoplasma* spp. hasta el 75 % de algunas especies de *Micrococcus* (Donkor, 2013). De media, una bacteria tiene alrededor de 2500 genes que no están distribuidos al azar sino de un modo concreto debido a presión selectiva (Guzmán et al, 2008). El genoma bacteriano codifica todas las funciones bioquímicas necesarias para la supervivencia de la bacteria, además de las características necesarias para virulencia en el caso de las bacterias patógenas.

El siguiente paso después de la secuenciación de un genoma es su ensamblaje y anotación. El primero consiste en el alineamiento y unión de los distintos fragmentos de DNA obtenidos (lecturas) para generar fragmentos más grandes (contigs). La anotación es la adjudicación de información biológica, estructural y funcional de los genes presentes en el genoma (Duan et al, 2010), basándose en la similitud con secuencias previamente caracterizadas y publicadas en bases de datos.

### **2.2.1. Secuenciación del DNA genómico de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074**

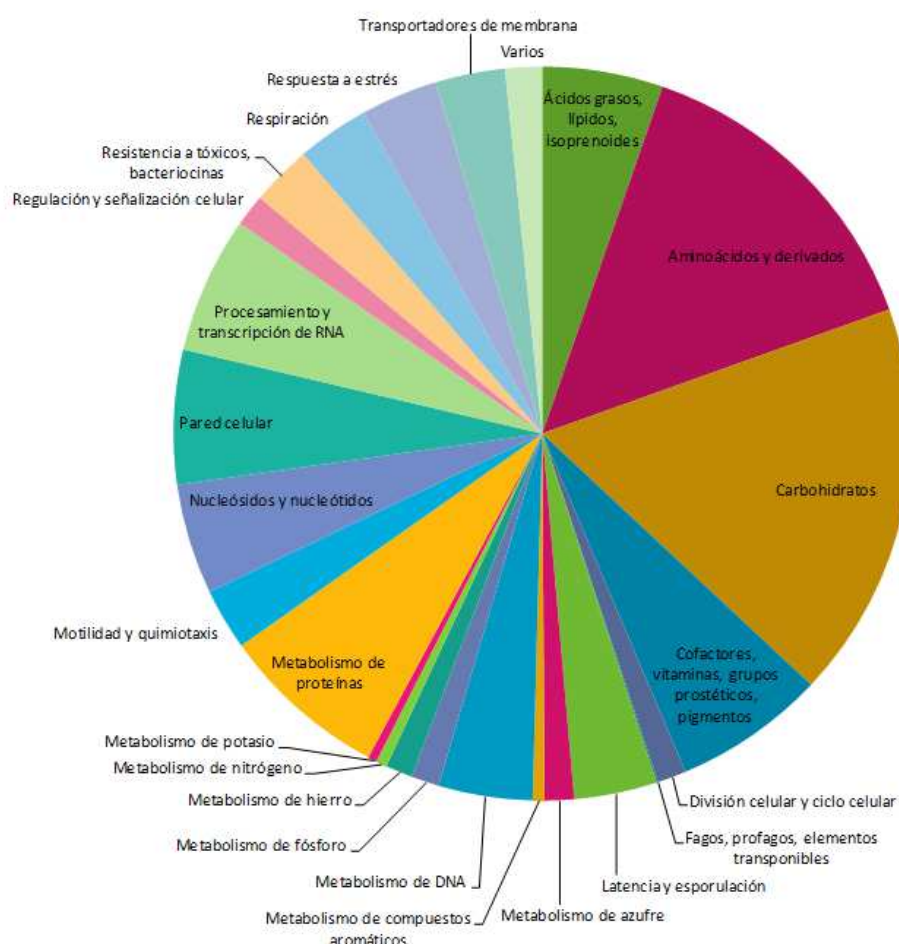
La secuenciación del DNA genómico de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se llevó a cabo mediante pirosecuenciación e *Illumina* (apartado 6 de Materiales y Métodos), mientras que su análisis se realizó en colaboración con el grupo del Dr. José Luis García. La secuencia del genoma de *B. psychrosaccharolyticus*, formada por 265 contigs, se encuentra depositada en los servidores DDBJ/EMBL/GenBank bajo el número de acceso AJTN000000000 (Fresco-Taboada et al, 2013b). El genoma, de 4,6 Mpb de tamaño y 38,7 % de contenido GC, presenta 4741 marcos de lectura abiertos con una función putativa asignada, además de 15 rRNAs y 85 tRNAs. El 42 % de las proteínas con una función asignada se pudieron clasificar dentro de familias proteicas, que a su vez se agrupan en diversos sistemas (Figura 36).

*B. psychrosaccharolyticus* contiene las rutas de Embden-Meyerhof y de Krebs así como las enzimas del ciclo del glioxilato. Las proteínas más abundantes son aquellas implicadas en biosíntesis de proteínas, ácidos grasos y polisacáridos de la pared celular, así como en procesamiento de RNA y en esporulación; siendo las familias con mayor número de proteínas la de biosíntesis de ácidos grasos tipo II (46 miembros) y la relacionada con la esporulación (94 miembros).

Las proteínas de respuesta a frío (cold shock proteins, CSPs) se inducen a temperaturas bajas y se unen a motivos localizados en el RNA, desestabilizando la estructura secundaria del RNA y por tanto, incrementando la eficacia de transcripción (Ermolenko et al, 2002). CspA es la única proteína de respuesta a frío que se identificó en el genoma de *B. psychrosaccharolyticus*,

cuando en *E. coli* existen otros 6 genes homólogos a *cspA*, *cspB-G* (Graumann et al, 1996). Por otro lado, se identificaron 59 genes que codifican proteínas implicadas en organización flagelar y 185 regiones codificantes relacionadas con la biosíntesis de cofactores, vitaminas, grupos prostéticos y pigmentos.

El contenido de GC de los tRNAs de *B. psychrosaccharolyticus* es mayor que en el conjunto del genoma (38,7 %), y es similar al contenido en GC de los tRNAs de mesófilos, por lo que no parece haber efecto de las bajas temperaturas sobre el contenido GC de los tRNAs de los organismos que habitan en ellas (Rabus et al, 2004). Por tanto, la flexibilidad de los tRNAs de microorganismos psicrófilos no se mantiene modificando el contenido en nucleótidos, sino a través de modificaciones post-transcripcionales, como la incorporación de dihidrouridina (Dalluge et al, 1997). En *B. psychrosaccharolyticus* se identificó una tRNA dihidrouridina sintasa B, así como otras enzimas implicadas en modificación de tRNAs (tRNA pseudouridina sintasa o tRNA metiltransferasa).



**Figura 36.** Clasificación en sistemas de los marcos de lectura con función putativa asignada.

### 2.2.2. Localización del gen *ndt* en el genoma de *B. psychrosaccharolyticus*

#### CECT 4074

La localización del gen *ndt* en la secuencia del genoma de *B. psychrosaccharolyticus* se llevó a cabo a través del programa BioEdit, empleando la secuencia de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus reuteri* (LrNDT) como referencia.

```

atg gcg aaa att tac cta gct tca cca ttt ttt aac gaa gaa caa ttg 48
M  A  K  I  Y  L  A  S  P  F  F  N  E  E  Q  L 16
aaa cat gtt tct aaa gcg gaa cag gtg tta cgt gac tta gga cat act 96
K  H  V  S  K  A  E  Q  V  L  R  D  L  G  H  T 32
gta ttt tca ccg aga gaa aat caa tta cct gaa gtt gaa ttt ggt tcg 144
V  F  S  P  R  E  N  Q  L  P  E  V  E  F  G  S 48
ttt gaa tgg cgc aca ttc gta ttc aag aat gac ttg gaa cat atc aaa 192
F  E  W  R  T  F  V  F  K  N  D  L  E  H  I  K 64
tgg gct gat att act ttt ggg att atc gga gat aac tat gat gat aca 240
W  A  D  I  T  F  G  I  I  G  D  N  Y  D  D  T 80
ggg act gca tgg gaa ctg ggc gcc tct tat att tta ggt aaa cct gtt 288
G  T  A  W  E  L  G  A  S  Y  I  L  G  K  P  V 96
atg tta ttc agc cca acc ggc gag atc atc aac ctt atg att acg gac 336
M  L  F  S  P  T  G  E  I  I  N  L  M  I  T  D 112
agc ctc cat gct tat ttt gaa gac tgg aat gac gtt gaa aac tat gac 384
S  L  H  A  Y  F  E  D  W  N  D  V  E  N  Y  D 128
ttt gct aca cta cct att aaa ccg tac tta aaa gca gtt aaa taa 429
F  A  T  L  P  I  K  P  Y  L  K  A  V  K  - 142

```

**Figura 37.** Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la hipotética nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa identificada a partir de la secuencia del genoma de *B. psychrosaccharolyticus*.

Se encontró únicamente una secuencia coincidente, con 25 % de identidad y 42 % de aminoácidos del mismo grupo, situada en el contig 167. Además, según la anotación



automática del programa RAST, en ese contig se encontraron 7 marcos de lectura abiertos, dos de ellos con funciones putativas asignadas, tRNA pseudouridina sintasa A y nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa. La secuencia de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa determinada mediante ambos algoritmos está formada por 429 pb, presenta 37,8 % de contenido GC y codifica 142 aminoácidos (Figura 37). El tamaño de esta proteína, obtenido a través del análisis de esta secuencia mediante el servidor ProtParam, es de 16,4 kDa.

Esta secuencia, obtenida a partir del contig 167 del genoma de *B. psychrosaccharolyticus*, es diferente a la obtenida mediante el cribado funcional en PAK6 (Figura 30), por lo que se realizó el alineamiento de esta nueva secuencia con las de las NDTs descritas en la bibliografía (Figura 38).

<b>LfNDT</b>	LKNDTPVANTKIY LATSFFNEEQRARIPQALAQLEANPTVGVV--HQPFDFQYKDARVDS	58
<b>LhPDT</b>	MKAVVPTG--KIY LGSPFYSDAQRERA AKAKELLAKNPSIAHV--FFPFDDGFTDPDEKN	56
<b>LrNDT</b>	---MINQKSKTVYFCAGWFTDKQNKAYEDAMNAIKANPTVDVENSYPVLQH QYKGLRVDE	57
<b>LlNDT</b>	-----MPKKTIIYFGAGWFTDRQNKAYKEAMEALKENPTIDL ENSYVPLDN QYKGIRVDE	54
<b>BpNDT</b>	-----MAKIY LASPFFNEEQ LKHVSKAEQVLR---DLGHTVVFSPRENQ-----	40
<b>LfNDT</b>	DPAGVFGSLEWQIATYNN LNAVGTSDVCVALYDMDQID EGICMEIGMFVALHKPIVLLP	118
<b>LhPDT</b>	PEIGGIRSMVWRDATYQND LTGISNATCGVFLYDMDQLD DGSAF EIGFMRAMHKPVILVP	116
<b>LrNDT</b>	HPE--LLQDREWSTATYNG DRVGVSTSDMLLAVYIPEEEDVGMGV ELGMARALGKYIMVVI	116
<b>LlNDT</b>	HPE--YLHDKVWATATYNN D LNKIKTNDIMLGVIYIPDEEDVGLGME LGYALSQGYVLLVI	113
<b>BpNDT</b>	LPEVEFGSFEWRTFVFKND LEHIKWADITFGIIGDNYD DTGTAW ELGASYILGKPVMLFS	100
<b>LfNDT</b>	FTKKDKSAYEAN LMLARGVTTWLEPN-DFSPLKDFNFNHPMAQPFPPFKVF	168
<b>LhPDT</b>	FTEHPEKEKKMNL MIAQGVTTIIDGNTEFEKLADYNFNECPSNPVRGYGIY	167
<b>LrNDT</b>	PDE--DFGKPINLMSWG----IADNFIKMSSELPNYDFNKPSYNFYDG-GVY	160
<b>LlNDT</b>	PDE--DYGKPINLMSWG----VSDNVIKMSQLKDFNFNKPRFDFYEG-AVY	157
<b>BpNDT</b>	PTG-----EIIINLMITDS---LHAYFEDWNDVENYDFATLPIKPYLKAVK-	142

**Figura 38.** Alineamiento con ClustalW de las secuencias de NDTs descritas con la hipotética NDT de *B. psychrosaccharolyticus* identificada a partir de la secuencia del genoma. Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas tipo II de *Lactobacillus fermentum* (LfNDT, código acceso GeneBank, gi 52000748), de *Lactobacillus reuteri* (LrNDT, gi 148544199), de *Lactobacillus leichmannii* (LlNDT, gi 9955126), y DRT tipo I de *Lactobacillus helveticus* (LhPDT, gi 47168984). En gris se encuentran marcados los aminoácidos que pueden formar parte del centro activo en base a los ya descritos para LlNDT y LhPDT (Figura 9).

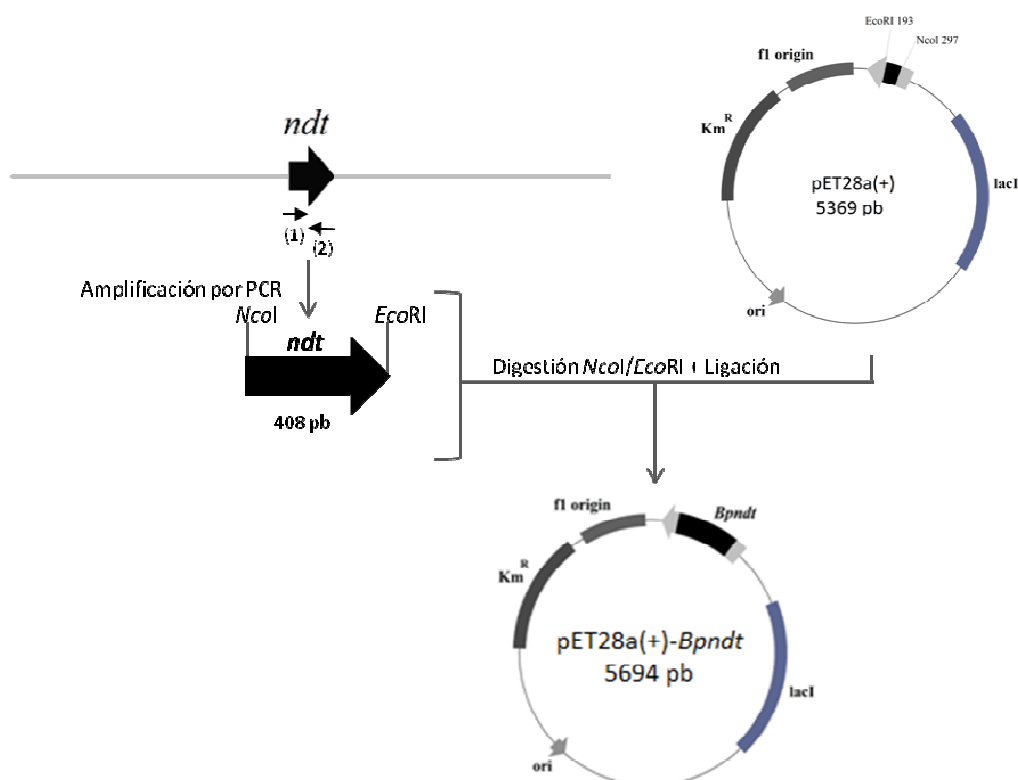
La secuencia de la hipotética NDT de *B. psychrosaccharolyticus* presenta los aminoácidos que en otras DRTs están implicados en reconocimiento y unión de sustrato, además de residuos del mismo tipo en el entorno de esos aminoácidos catalíticos. El único residuo localizado en otras DRTs que no se encuentra en la secuencia de la hipotética BpNDT es la tirosina terminal, lo que podría deberse a su menor tamaño (aproximadamente 16 aminoácidos más corta) en comparación con las DRTs de *Lactobacilli*. Como se ha descrito en la introducción, el carboxilo de la tirosina terminal, que se encargaría de protonar la base saliente, no es tan importante en las NDTs como en las PDTs (Fresco-Taboada et al, 2013a), y esta función podría ser llevada a cabo por el grupo carboxilo de otro aminoácido terminal, como sucede en LfNDT. Además, aunque no se encuentra alineada con las demás, la Gln<sup>40</sup> de BpNDT podría estar localizada estructuralmente en la misma zona y desempeñar la misma función que la Gln<sup>46</sup> de LfNDT, ya que la glutamina está presente en todas las DRTs de tipo II.

Para determinar el tipo de actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa (tipo I o II) de la proteína codificada y llevar a cabo su caracterización, se procedió a clonar y expresar el gen *ndt* de *B. psychrosaccharolyticus* (*Bpndt*) en *E. coli* BL21 (DE3).

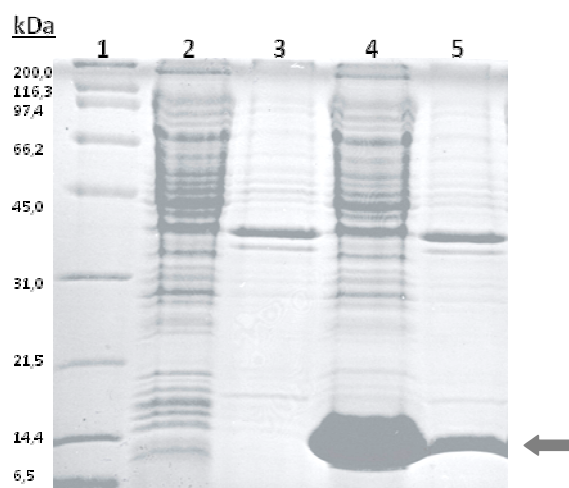
### 2.2.3. Clonación y expresión del gen *ndt* en *E. coli* BL21 (DE3)

El gen *ndt* identificado mediante el análisis de la secuencia del genoma de *B. psychrosaccharolyticus* se clonó en el plásmido pET28a(+) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos, obteniéndose el plásmido recombinante pET28a(+)-*Bpndt* (Figura 39).

La expresión del gen en *E. coli* BL21 (DE3) se llevó a cabo tras transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido recombinante pET28a(+)-*Bpndt*, cultivarlas en medio LB:Km (50 µg/mL) a 37 °C e inducir con IPTG 0,5 mM (apartado 8.1 de Materiales y Métodos). Las células recombinantes se lisaron mediante sonicación y, tras centrifugar para separar el extracto celular libre de células y el precipitado, se observó el resultado mediante electroforesis PAGE-SDS (Figura 40).



**Figura 39.** Representación esquemática de la clonación del gen *ndt* de *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 en el vector de expresión pET28a(+). Las abreviaturas indicadas en el esquema son: Km<sup>R</sup> (gen que confiere resistencia a kanamicina), ori (origen de replicación), f1 origin (origen de replicación del bacteriófago f1), lacI (inhibidor del operón *lac*); oligonucleótidos: (1) BpsecNcoI, (2) BpsecEcoRI (Tabla 4).



**Figura 40.** PAGE-SDS en geles de poliacrilamida 15 % de la expresión del gen *ndt* en *E. coli* BL21 (DE3). 1- Marcadores de masa molecular *Broad Range* (Bio-Rad, Estados Unidos), 2- Extracto celular control (*E. coli* BL21 (DE3)-pET28a(+)), 3- Precipitado control, 4- Extracto celular del clon recombinante (*E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*Bpndt*), 5- Precipitado del clon recombinante. La banda de interés se indica con la flecha.

En el extracto celular, obtenido tras la lisis celular (fracción soluble), se observó mediante PAGE-SDS (Figura 40) la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 16 kDa, coincidente con el tamaño determinado a partir de la secuencia de aminoácidos mediante la aplicación web ProtParam. Se detectó la misma banda proteica en la fracción de los desechos celulares, aunque en mucha menos cantidad, lo cual puede deberse a que no se hubiese producido la lisis celular en su totalidad.

Debido a la presencia de nucleósido fosforilasas en el hospedador, *E. coli* BL21 (DE3), no se puede llevar a cabo la determinación de la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa empleando el extracto celular, ya que se producen interferencias de las mismas sobre esta. Por este motivo se procedió a la purificación de la proteína para determinar dicha actividad, así como para abordar su caracterización e inmovilización.

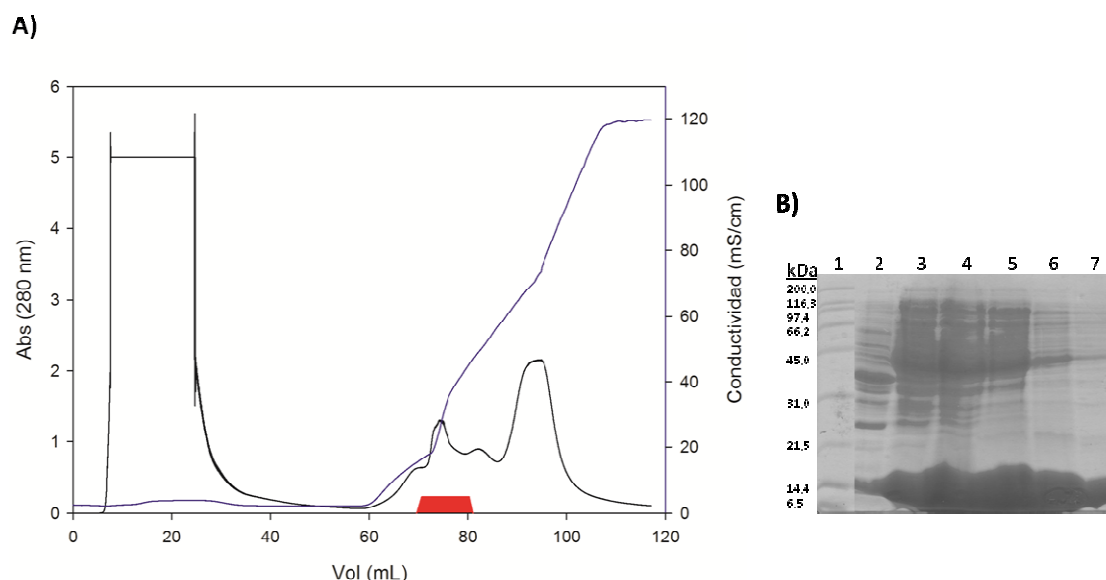
### **3. Purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 recombinante (*Bp*NDT) expresada en *E. coli* BL21 (DE3)**

Con el fin de abordar la purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* se crecieron las células recombinantes *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a(+)-*Bpndt* en 2 L de LB:km (50 µg/mL) y se indujeron con IPTG, se resuspendieron en 25 mL de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,0 y se lisaron siguiendo las condiciones descritas en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos. La purificación de *Bp*NDT presente en el extracto celular obtenido se purificó mediante tres pasos cromatográficos: cromatografía de intercambio aniónico, de exclusión molecular e isoenfoque, de acuerdo al protocolo de purificación puesto a punto para la enzima silvestre producida por *B. psychrosaccharolyticus* (apartado 1.3 de Resultados).

#### **Cromatografía de intercambio iónico**

El extracto celular procedente de la lisis celular se aplicó en una columna *Bio-scale Mini UNO-sphere Q* (Bio-Rad, Estados Unidos) equilibrada en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7 a flujo 0,5 mL/min como se describe en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. *Bp*NDT es una proteína con carga neta negativa, por lo que al ser cargada en una columna con grupos positivos como la *Bio-scale Mini UNO-sphere Q* su elución no se produce hasta que no se aplica un tampón con alta fuerza iónica, como se puede observar en el perfil de elución que se representa en la figura 41.

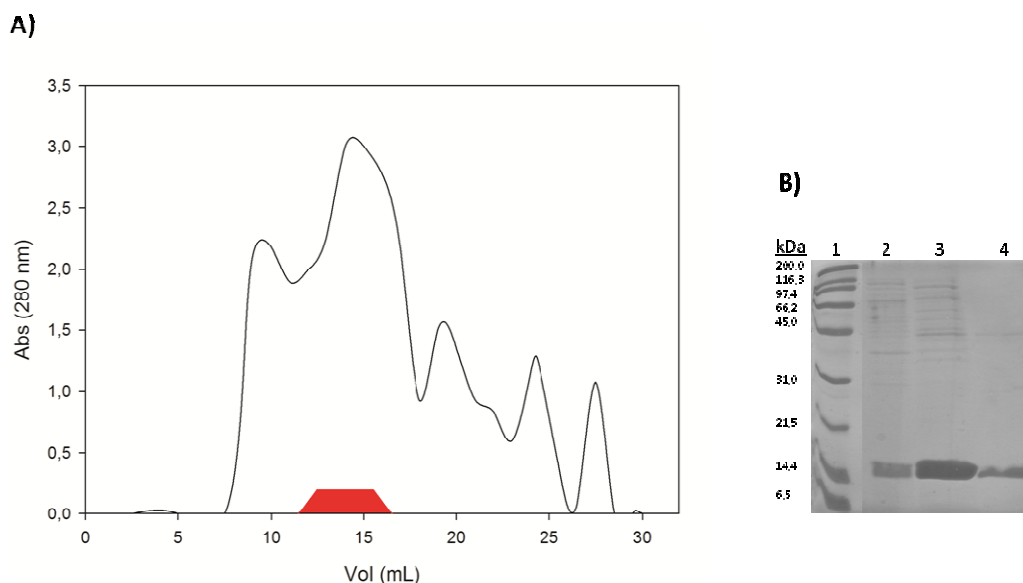
Debido a la interferencia de las nucleósido fosforilasas, la presencia de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa se detectó mediante PAGE-SDS, observándose que *Bp*NDT sólo eluye al aumentar la fuerza iónica. Las fracciones en las que se detectó la presencia de *Bp*NDT se juntaron y concentraron en lecho de PEG-35000 para llevar a cabo el segundo paso de la purificación.



**Figura 41. A)** Perfil de elución de la cromatografía de intercambio aniónico en columna *Bio-scale Mini UNO-sphere Q*, primer paso en la purificación de *Bp*NDT. En negro se representa el perfil de absorbancia de las proteínas eluidas, en azul la conductividad de la muestra y en rojo la presencia de *Bp*NDT mediante PAGE-SDS. **B)** PAGE-SDS en geles de poliacrilamida 12,5 % de las fracciones que presentan *Bp*NDT. 1- Marcadores de masa molecular *Broad Range* (Bio-Rad, Estados Unidos), 2-7-fracciones con *Bp*NDT.

### Cromatografía de exclusión molecular

Las proteínas contenidas en las fracciones seleccionadas y concentradas en el paso anterior se aplicaron en una columna *Superosa 12 10/300 GL* (GE Healthcare, Estados Unidos) equilibrada en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7 y se separaron según su tamaño, obteniéndose el perfil de elución de la figura 42.

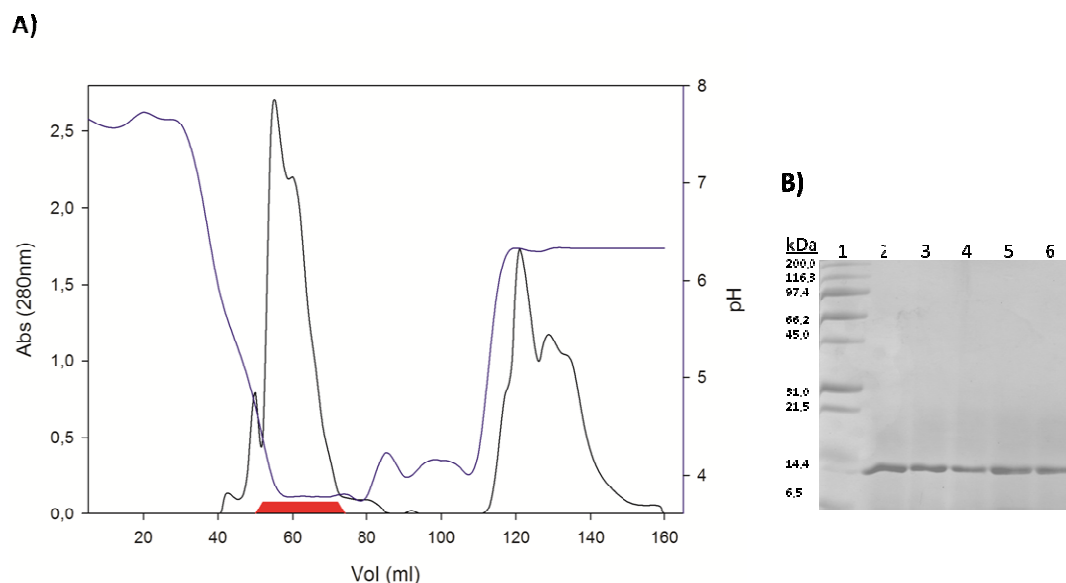


**Figura 42. A)** Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular en columna *Superosa 12 10/300 GL*. En negro se representa el perfil de absorbancia de las proteínas eluidas y en rojo la presencia de *BpNDT* mediante PAGE-SDS. **B)** PAGE-SDS en geles de poliacrilamida 12,5 % de las fracciones que presentan *BpNDT*. 1- Marcadores de masa molecular *Broad Range* (Bio-Rad, Estados Unidos), 2-4- fracciones con *BpNDT*.

Las fracciones en las que se detectó la presencia de *BpNDT* mediante PAGE-SDS se juntaron y dializaron para llevar a cabo el último paso de la purificación.

### Cromatografía de isoenfoque

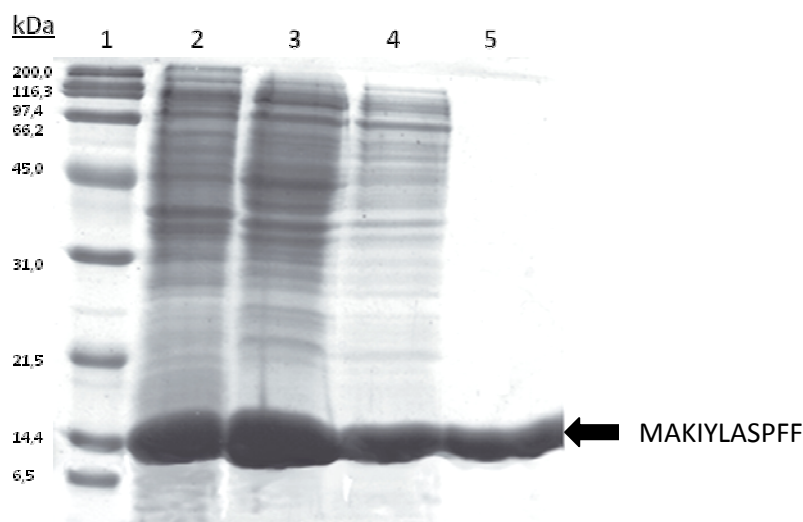
Las proteínas contenidas en las fracciones seleccionadas, después de ser dializadas a tampón imidazol 25 mM, pH 7,4, se aplicaron en una columna *MonoP 5/200 GL* (GE Healthcare, Estados Unidos) (apartado 9.2 de Materiales y Métodos). La cromatografía de isoenfoque permitió separar las proteínas procedentes del paso anterior según su punto isoeléctrico. Como se puede observar en la figura 43, *BpNDT* eluyó cuando el gradiente de pH alcanzó el valor 4,5-4, concordante con el pI teórico de la proteína calculado mediante el programa ProtParam (4,6). Una vez finalizado el gradiente de pH se aplicó un tampón de alta fuerza iónica para permitir la elución de todas aquellas proteínas que seguían retenidas. De nuevo, la presencia de *BpNDT* en las fracciones se detectó mediante PAGE-SDS.



**Figura 43.** Perfil de elución del isocromatoenfoque en columna Mono P 5/200 GL. En negro se representa el perfil de absorbancia de las proteínas eluidas, en azul el perfil de pH y en rojo la presencia de *BpNDT* mediante PAGE-SDS. **B)** PAGE-SDS en geles de poliacrilamida 12,5 % de las fracciones que presentan *BpNDT*. 1- Marcadores de masa molecular *Broad Range* (Bio-Rad, Estados Unidos), 2-6- fracciones con *BpNDT*.

La pureza de la proteína en los distintos pasos cromatográficos se determinó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes PAGE-SDS (Figura 44).

En el extracto celular procedente de la sonicación se encontraban todas las proteínas intracelulares de *E. coli* BL21 (DE3), las cuales fueron disminuyendo al aumentar el número de pasos cromatográficos. La separación por punto isoeléctrico de las proteínas restantes en la muestra después de los dos primeros pasos permitió obtener *BpNDT* pura (carril 5, figura 44). La producción obtenida fue 9,8 mg por L de caldo de cultivo.



**Figura 44.** PAGE-SDS en geles de poliacrilamida 15 % de los distintos pasos de purificación de *BpNDT*. 1- Marcadores de masa molecular *Broad Range* (Bio-Rad, Estados Unidos), 2- Extracto celular después de la sonicación, 3- *BpNDT* después de la cromatografía de intercambio aniónico, 4- *BpNDT* después de la exclusión molecular, 5- *BpNDT* pura después del isocromatoenfoco. Flecha: secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de *BpNDT*.

Seguidamente, para comprobar que la enzima purificada es el producto de expresión del gen *ndt* clonado, se procedió a la determinación de la secuencia amino terminal de *BpNDT* recombinante.

### 3.1. Análisis de la secuencia amino terminal de la *BpNDT* recombinante

Con el fin de determinar la secuencia amino terminal de *BpNDT* recombinante, se transfirió la proteína a una membrana de PVDF según se describe en el apartado 11.2 de Materiales y Métodos, y el extremo amino terminal de la enzima pura se secuenció en el servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC).

La secuencia obtenida, “MAKIYLSPFF” (Figura 44) coincide con la región amino terminal de la secuencia de la figura 37, confirmándose así que la proteína purificada es la *BpNDT* y que el gen *ndt* se está expresando dando lugar a una proteína soluble.

### 3.2. Determinación del tipo de nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa

Una vez purificada y comprobado que *BpNDT* recombinante es el producto de la expresión del gen *ndt* se procedió a determinar si la proteína purificada presentaba actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de tipo II, como se determinó para *BpNDT* no recombinante, mediante el análisis de su capacidad de síntesis empleando como donadores tanto



ribonucleósidos como desoxinucleósidos y como aceptores tanto purinas como pirimidinas, bajo las condiciones estándar de ensayo (apartado 10.2 de Materiales y Métodos) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Actividad de *Bp*NDT sobre distintos sustratos.

dUrd + Ade	Ino + Ade	Urd + Ade	dUrd + Thy
+	-	-	+

Condiciones de reacción: 0,40 µg de enzima se incubaron 5 min a 40 °C con 40 µl de sustratos 10 mM en tampón MES 50 mM pH 6,5 o fosfato potásico 50 mM pH 7,0.

Como se puede observar en la tabla 8, *Bp*NDT puede llevar a cabo la reacción de transferencia únicamente si el donador es 2'-desoxirribonucleósido, pero su actividad es independiente del tipo de base, es decir, *Bp*NDT recombinante es una nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de tipo II (Holguin et al, 1975a). De este modo también se comprobó que la preparación de *Bp*NDT está libre de trazas de nucleósido fosforilasas, que pueden reconocer ribonucleósidos (Bzowska et al, 2000).

#### 4. Caracterización funcional de *Bp*NDT

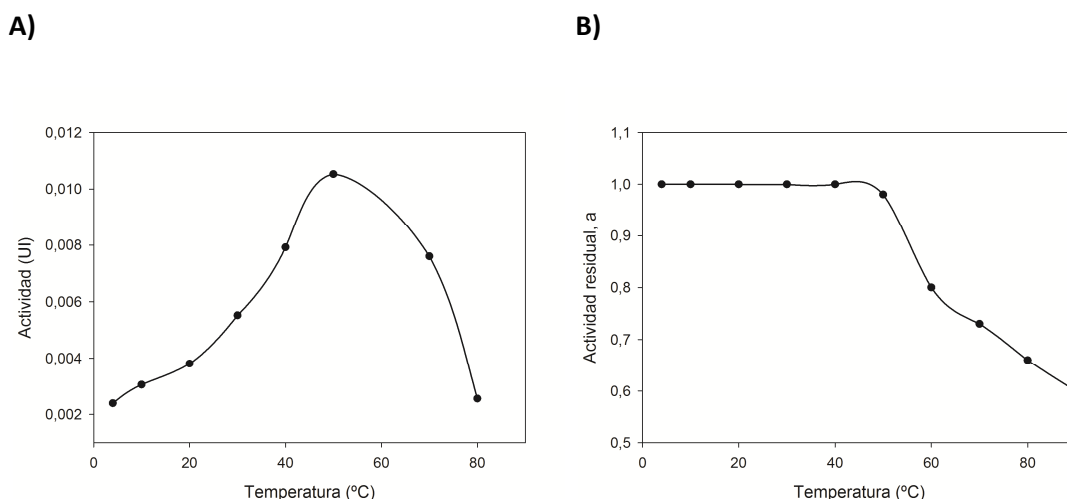
Después de determinar que la proteína purificada presentaba actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de tipo II, se procedió a la caracterización funcional de la enzima mediante el estudio del efecto de la temperatura, pH, así como fuerza iónica y diversos cationes mono y divalentes en su actividad. Asimismo se ha abordado el estudio de la especificidad de sustrato de la enzima con distintos nucleósidos y bases naturales y no naturales, la determinación de los parámetros cinéticos de la reacción y la variación de los mismos con el pH.

##### 4.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de *Bp*NDT

El comportamiento de la enzima a diferentes temperaturas, entre 4 y 80 °C, se estudió siguiendo las condiciones descritas en el apartado 12 de Materiales y Métodos.

Respecto al efecto de la temperatura sobre la actividad de *Bp*NDT se pueden diferenciar tres etapas (figura 45 A). A temperaturas bajas, 4 y 10 °C, la enzima presenta entre el 25 y 30 % de la actividad máxima. Entre 20 y 50 °C la actividad específica se incrementa 10 UI/mg por cada 10 °C de aumento, alcanzando su máximo a 50 °C. A partir de esta temperatura la actividad disminuye de forma considerable.

En cuanto a la estabilidad de *Bp*NDT a diferentes temperaturas, la enzima se mantiene totalmente estable cuando se incuba entre 4 y 40 °C al menos durante 15 minutos. A 50 °C pierde un 7 % de actividad, mientras que a temperaturas más altas mantiene menos del 80 % de actividad (figura 45 B).



**Figura 45. A)** Efecto de la temperatura sobre la actividad de *Bp*NDT. Condiciones de reacción: 0.2 µg de enzima se incubaron con 40 µL de dUrd y Ade 10 mM en tampón MES 50 mM pH 6.5 durante 5 min a distintas temperaturas. **B)** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de *Bp*NDT. La enzima se incubó a distintas temperaturas durante 15 min y a continuación se realizó el ensayo estándar.

Considerando ambos estudios, los ensayos posteriores se llevaron a cabo a 40 °C, para no afectar a la estabilidad de la enzima.

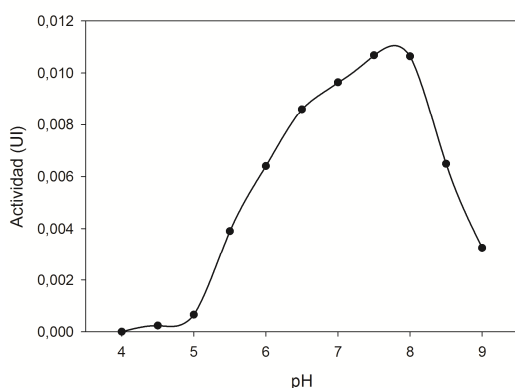
El cálculo de la energía de activación de *Bp*NDT se llevó a cabo aplicando la ecuación de Arrhenius, ecuación [3] (apartado 12 de Materiales y Métodos), con los datos experimentales del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima en tampón HEPES 50 pH 8, obteniéndose el valor 36,0 kJ/mol.

#### 4.2. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de *Bp*NDT

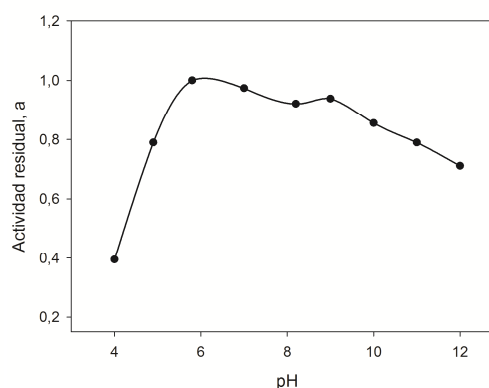
El estudio del efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de *Bp*NDT se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 13 de Materiales y Métodos. El ensayo elegido no fue la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina y adenina, sino la síntesis de timidina empleando 2'-desoxiuridina y timina como sustratos (Figura 46). La timina y el uracilo presentan *pK*<sub>a</sub>s elevados, 9,7 y 9,2 respectivamente, por lo que entre pH 4,0 y 9,0 tanto los sustratos como los productos de reacción se encuentran en forma neutra. En los estudios del

efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima se pudo continuar el estudio hasta pH 12,0 porque previamente a llevarse a cabo la reacción, el pH se ajustó a pH 6,5.

A)



B)



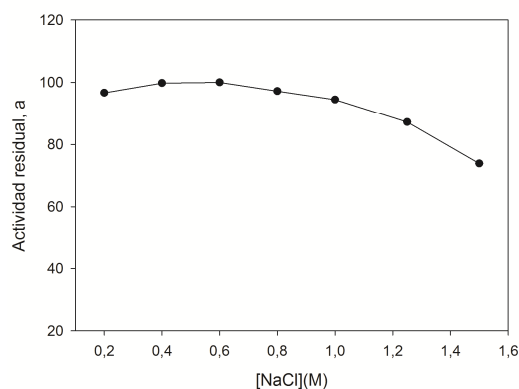
**Figura 46. A)** Efecto del pH sobre la actividad de *BpNDT*. Condiciones de reacción: 0,4 µg de enzima se incubaron con 40 µL de dUrd y Thy 10 mM en tampón citrato-fosfato-borato 10 mM a distintos valores de pH durante 5 min, 40 °C, 30 r.p.m. **B)** Efecto del pH sobre la estabilidad de *BpNDT*. La enzima se incubó durante 15 min a distintos valores de pH y después se llevó a cabo el ensayo de síntesis de timidina en condiciones estándar.

*BpNDT* presenta su máxima actividad a pH 7,5-8,0, mientras que la enzima es estable en el intervalo de pH 6,0-9,0. Por tanto, a partir de este momento los ensayos de actividad se realizaron a pH 8, en tampón HEPES 50 mM pH 8,0.

### 4.3. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de *BpNDT*

El efecto de la fuerza iónica (*I*) sobre la actividad de *BpNDT* se determinó mediante la adición de distintas concentraciones de NaCl al tampón de reacción (apartado 14 de Materiales y Métodos).

En la figura 47 se observa que la actividad de *BpNDT* se mantiene estable cuando la concentración de NaCl no supera 0,8 M. A partir de este punto la actividad de la enzima comienza a descender, perdiendo el 25 % de actividad cuando la concentración de NaCl asciende hasta 1,5 M.



**Figura 47.** Comportamiento de la actividad de *BpNDT* a diferentes valores de fuerza iónica (*I*). Condiciones de reacción: 0,4  $\mu$ g de enzima se incubaron con 40  $\mu$ L de dUrd y Ade 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8,0, NaCl 0-1,5 M a 40 °C, 5 min.

#### 4.4. Influencia de la presencia de cationes sobre la actividad de *BpNDT*

Se determinó el efecto de la presencia de cationes sobre la actividad de la enzima siguiendo el protocolo descrito en el apartado 14 de Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la tabla 9, ni los cationes monovalentes ni la presencia de los divalentes  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  afectaron a la actividad; mientras que  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  sí mostraron efecto inhibitorio, disminuyendo drásticamente la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa hasta el 8 % en presencia de 5 mM de  $\text{Mn}^{2+}$ .

La presencia de 2-mercaptoetanol no interfirió en la actividad de *BpNDT*, ya que la enzima no presenta cisteínas en su secuencia de aminoácidos. Tampoco se produjo cambio en la actividad en presencia de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , EDTA o  $\text{Al}^{3+}$  1 mM, pero disminuyó considerablemente cuando la concentración de  $\text{Al}^{3+}$  aumentó hasta 5 mM.

Ninguno de los cationes estudiados ejerció efecto positivo sobre la actividad de *BpNDT*, por lo que las reacciones de transferencia del grupo 2'-desoxirribósido se realizaron en ausencia de los mismos.

**Tabla 9.** Actividad de *Bp*NDT en presencia de cationes monovalentes, divalentes y otros aditivos.

Reactivo	Actividad relativa (%) (concentración final 1 mM)	Actividad relativa (%) (concentración final 5 mM)
Ninguno	100	100
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	96.1
KCl	100	100
LiCl	100	100
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	97.1	95.7
NaCl	96.6	98.2
RbCl	95.9	100
BaCl <sub>2</sub>	98.1	91.8
CaCl <sub>2</sub>	84.0	74.7
CoCl <sub>2</sub>	33.0	21.8
CuSO <sub>4</sub>	63.7	22.3
MgSO <sub>4</sub>	86.6	95.7
MgCl <sub>2</sub>	88.5	90.1
MnCl <sub>2</sub>	32.6	8.1
ZnSO <sub>4</sub>	91.5	57.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	98.8
2-mercaptoetanol	98.9	97.5
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	90.7	18.2
FeCl <sub>3</sub>	95.6	100
EDTA	100	100

Condiciones de reacción: 0,4 µg de enzima se incubaron en 40 µL de dUrd y Ade 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8,0 a 40 °C, 5 min, en presencia de 1-5 mM del catión correspondiente.

#### 4.5. Estudio de la especificidad de sustrato de *Bp*NDT

##### 4.5.1. Síntesis de nucleósidos naturales

La síntesis de nucleósidos naturales para identificar los mejores nucleósidos donadores y las mejores basesceptoras para *Bp*NDT se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas en el apartado 15 de Materiales y Métodos. La tabla 10 muestra la actividad específica de *Bp*NDT sobre distintos donadores y aceptores naturales.

**Tabla 10.** Síntesis de nucleósidos naturales catalizada por *Bp*NDT.

Donador	Act esp (UI/mg proteína) con aceptor:				
	Ade	Ura	Cyt	Thy	Hyp
dAdo		24.4	36.8	26.1	43.5
dUrd	40.0		45.4	24.9	41.7
dCyd	61.2	60.0		47.8	84.6
Thd	51.0	26.1	31.3		38.3
dIno	20.7	15.4	18.0	40.6	
dGua	38.8	16.2	36.3	8.1	22.4

Condiciones de reacción: 0,40 µg de enzima se incubaron a 40 °C durante 5 min con sustratos 10 mM en 40 µl de tampón HEPES 50 mM pH 8.

Como ya se determinó en el apartado 3.2 de Resultados, *Bp*NDT cataliza la transferencia entre bases púricas y pirimidínicas, como corresponde a una nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de tipo II (Holguin et al, 1975a). *Bp*NDT presenta preferencia por los nucleósidos pirimidínicos como donadores, siendo la 2'-desoxicitidina el mejor donador, seguido por 2'-desoxiuridina y timidina. Por el contrario, la enzima cataliza más efectivamente la transferencia del grupo 2'-desoxirribosa cuando el aceptor es una base púrica, siendo la hipoxantina el mejor y el uracilo el peor aceptor. Al comparar estos resultados con los descritos para otras NDTs, *Bp*NDT muestra mayor actividad específica que otras NDTs, con excepción de la NDT de *Lactobacillus reuteri* (*Lr*NDT) (Fernández-Lucas et al, 2010). En particular, la síntesis de dIno a partir de Hyp y dAdo es 5,4 veces mayor en *Bp*NDT que en *Lr*NDT o la NDT de *Lactobacillus helveticus* (*Lh*NDT) (Kaminski, 2002; Kaminski et al, 2008b), mientras que la *Lr*NDT o la NDT de *Lactococcus lactis* (*Ll*NDT) (Miyamoto et al, 2007) presentan dos veces más actividad en la transferencia entre Thd y Ura que *Bp*NDT. La síntesis de dAdo a partir de Ade y Thd es 1,5 y 4,3 veces mayor en *Bp*NDT que en *Lr*NDT y *Lh*NDT respectivamente. Por último, la actividad catalítica de *Bp*NDT en la transferencia entre dCyd e Hyp es 12 veces mayor que la de *Lh*NDT y la NDT de *Lactobacillus fermentum* (*Lf*NDT) (Kaminski et al, 2008a).

La reacción sobre la que se obtuvo mayor actividad específica empleando *Bp*NDT fue dCyd e Hyp, pero debido a la baja solubilidad de la Hyp (1 mg/mL) se determinó dCyd y Ade como sustrato para llevar a cabo la reacción cuando se requiera la actividad máxima de *Bp*NDT.

#### 4.5.2. Síntesis de nucleósidos no naturales

La síntesis de análogos de nucleósidos, muchos de ellos empleados como fármacos antivirales y antitumorales, se llevó a cabo de dos modos distintos, a partir de un nucleósido natural (dUrd o dCyd) y una base no natural, o a partir de un nucleósido no natural y una base natural (Ura, Cyt, Hyp). La reacción de síntesis se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 15 de Materiales y Métodos.

**Tabla 11.** Síntesis de nucleósidos no naturales a partir de un nucleósido natural y una base no natural.

Aceptor	Actividad específica, UI/mg proteína (conversion, %) con donador:	
	dUrd	dCyd
5-Azacitosina (5-azaCyt)	4.2 (42)	ND <sup>1</sup>
Benzimidazol (B)	7 (75)	6.2 (68)
N-Benzoiladenina (N-BAde)	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
5-Etiluracilo (5-EtUra)	3.6 (40)	3.5 (40)
2-Fluoroadenina (2-FAde)	7.5 (86)	6.2 (72)
5-Trifluorotimina (5-TFThy)	4.2 (42)	3.5 (35.5)
2,6-Diaminopurina (2,6-DAP)	8.9 (89)	7.4 (82)
6-Mercaptopurina (6-M)	5.5 (55)	4 (40)
5-Clorouracilo (5-ClUra)	3.8 (38)	3.5 (35)
5-Fluorocitosina (5-FCyt)	ND <sup>1</sup>	5 (50)
5-Fluoro-2-metoxi-4(1H)pirimidinona (5-FMP)	1.15 (18)	0.4 (5)
5-Fluorouracilo (5-FUra)	4.0 (40)	4.0 (40)
5-Bromouracilo (5-BrUra)	0.5 (3.6)	1.0 (3.5)
5-Yodouracilo (5-IUra)	4.1 (41)	3.9 (39)
7-Deaza-6-hidroxipurina (7-DHP)	1.6 (15)	1.6 (16)
4-Hidroxi-2-mercapto-6-metilpirimidina (4-HMMeP)	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
6-Propil-2-tiouracilo (6-PTUra)	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
6-Metiluracilo (6-MeUra)	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
5-Hidroximetiluracilo (5-HMeUra)	ND <sup>1</sup>	4 (42)
5-Metilcitosina (5-MeCyt)	0.9	0.7
Teofilina (Teo)	4.5 (45)	4.2 (4.2)

Condiciones de reacción: 0,40 µg de enzima se incubaron a 40 °C durante 20 min o 2 h con 40 µL de sustratos 1,95 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8. <sup>1</sup>ND, no detectado. La actividad específica se calculó con el valor de actividad después de 20 min de reacción, mientras que el valor de conversión (%) se calculó con el valor de actividad después de 2 h de reacción.

Como se puede observar en la tabla 11, *Bp*NDT es capaz de catalizar la transferencia del grupo 2'-desoxirribosa a partir de los mejores donadores naturales, dUrd o dCyd, a la mayoría de las bases no naturales ensayadas, con un rendimiento ligeramente menor que el descrito para *Lr*NDT cuando se emplea dUrd como donador (Fernández-Lucas et al, 2010; Fernández-Lucas

et al, 2011). En algunos casos, como 5-azacitosina, 5-fluorocitosina o 5-hidroximetiluracilo, solo se generaron los productos a partir de uno de los dos donadores, mientras que en otros (6-metiluracilo, 6-propil-2-tiouracilo y 4-hidroxi-2-mercapto-6-metilpirimidina) no se detectó el producto con ninguno de los dos donadores.

Las actividades específicas más altas se alcanzaron cuando se emplearon bases voluminosas, bases púricas, como la 2,6-diaminopurina, la 2-fluoroadenina o el benzimidazol; es decir, se corrobora lo observado para los sustratos naturales, las bases púricas son mejores aceptores que las pirimidínicas.

Por otro lado, en lo que concierne a la síntesis de nucleósidos no naturales a partir de nucleósido no natural y base natural, *Bp*NDT presentó actividad únicamente cuando se empleó DFU como sustrato (Tabla 12), con una actividad específica 2 veces más alta que la mostrada por *Lr*NDT (Fernández-Lucas et al, 2010). *Bp*NDT no reconoce sustratos tipo arabinosilnucleósido, en contraste con lo descrito para otras NDTs (Fernández-Lucas et al, 2010).

**Tabla 12.** Síntesis de nucleósidos no naturales a partir de nucleósido no natural y base natural.

Donador	Actividad específica ( $10^{-3}$ UI/mg proteína) con aceptor:		
	Ura	Cyt	Hyp
<i>ara</i> -Uracilo ( <i>ara</i> U)		ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
<i>ara</i> -Adenina ( <i>ara</i> A)	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
2'-fluoro-2'-desoxiuridina (DFURD)		7,9	ND <sup>1</sup>
2'-fluoro- <i>ara</i> -Uracilo (2'- <i>Fara</i> U)		ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (dFCyd)	ND <sup>1</sup>		ND <sup>1</sup>
2'-O-metil-5-metilcitidina (O-dMeCyd)	ND <sup>1</sup>		ND <sup>1</sup>

Condiciones de reacción: 0,40 µg de enzima se incubaron a 40 °C durante 24 h con 40 µl de sustratos 1 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8. <sup>1</sup>ND, no detectado.

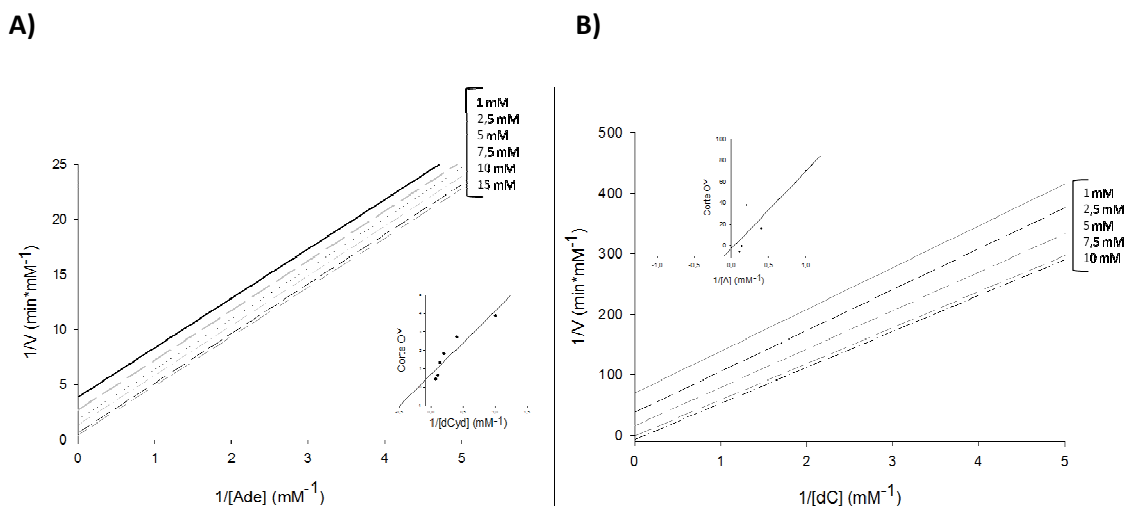
#### 4.6. Determinación de los parámetros cinéticos de *Bp*NDT

Los parámetros cinéticos de *Bp*NDT,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_m$ , fueron determinados para la síntesis sobre la que presenta mayor actividad específica, la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxicitidina y adenina, según las condiciones descritas en el apartado 16 de Materiales y Métodos. Para ello se ajustaron los datos a la ecuación [5].

La representación de dobles inversas ( $1/V$  frente a  $1/[S]$ ) cuando la 2'-desoxicitidina se mantiene a concentración fija y la adenina variable entre 0,25 y 60 mM, o viceversa, produjo



líneas paralelas (Figura 48), probando que la reacción de transferencia del grupo 2'-desoxirribósido entre bases sigue un mecanismo Ping-Pong Bi-Bi (Cook et al, 2007; Danzin et al, 1974). Por otro lado, cuando se aumentó la concentración de Ade fija a 15 mM y se varió la concentración de dCyd, se obtuvo una recta que se cruza con las anteriores, indicando inhibición por el segundo sustrato de la reacción, la adenina, a concentraciones altas.



**Figura 48.** Velocidad inicial para la reacción  $dCyd+Ade \rightarrow Cyt+dAdo$  con **A)** adenina como sustrato variable y 2'-desoxicitidina como sustrato fijo (figura insertada: variación de la ordenada en el origen con la concentración de dCyd); **B)** dCyd como sustrato variable y Ade como sustrato fijo (figura insertada: variación de la ordenada en el origen con la concentración de Ade).

Los parámetros cinéticos obtenidos (Tabla 13) son del mismo orden que los publicados para otras NDTs (Fernández-Lucas et al, 2010; Kaminski et al, 2008b), siendo mayor el valor de  $K_m$  para la 2'-desoxicitidina, el desoxinucleósido, que para la adenina, la base.

**Tabla 13.** Parámetros cinéticos de *Bp*NDT.

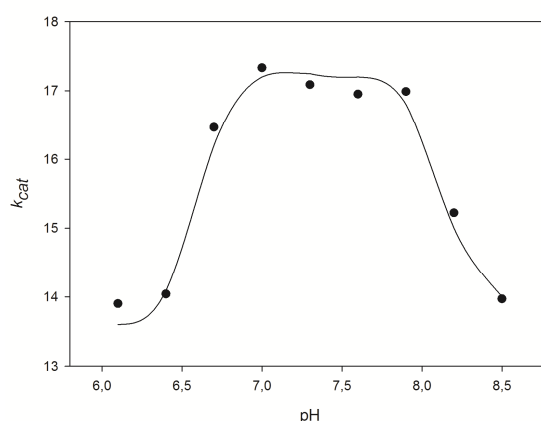
Parámetros	Valor con sustrato variable	
	Ade	dCyd
$K_m$ (mM)	$0,37 \pm 0,1$	$2,03 \pm 0,29$
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$28,2 \pm 0,13$	$24,6 \pm 0,14$
$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \cdot M^{-1}$ )	$7,6 \cdot 10^4 \pm 0,10$	$1,2 \cdot 10^4 \pm 0,13$

Condiciones de reacción: 0,4  $\mu g$  de enzima se incubaron a 40 °C durante 5 min con dCyd y Ade a diferentes concentraciones en 40  $\mu L$  de HEPES 50 mM pH8.

#### 4.7. Variación de la $k_{cat}$ con el pH

El estudio del efecto del pH sobre los parámetros cinéticos permite obtener información sobre los residuos ionizables de la enzima implicados en catálisis y unión de sustrato.

Se determinaron los parámetros cinéticos a distintos valores de pH siguiendo la metodología descrita en el apartado 16.1 de Materiales y Métodos. La dependencia de  $k_{cat}$  del pH y su ajuste a la ecuación [6] (Figura 49) permitieron el cálculo de los pKas de los residuos implicados en catálisis a través del programa TableCurve 2D v5.01 (Systat Software Inc).



**Figura 49.** Perfil de la variación de  $k_{cat}$  con el pH. Condiciones de reacción: 0,40  $\mu$ g de enzima se incubaron a 40 °C durante 5 min con dCyd (0,25-50 mM) y Ade (5 mM) en 40  $\mu$ l de tampón citrato/fosfato/borato 10 mM pH 6,1-9,1.

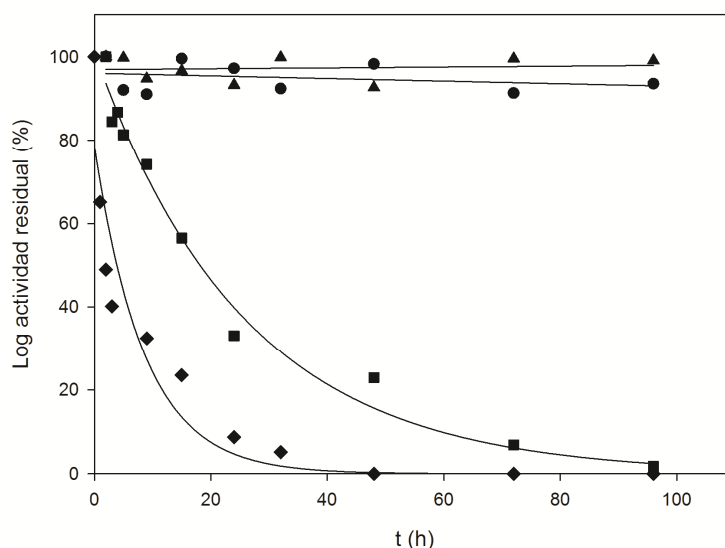
Al ajustar los datos de  $k_{cat}$  obtenidos para cada pH a la ecuación 6 (apartado 16.1 de Materiales y Métodos) se obtuvo el valor de la constante de ionización de cada residuo, pudiéndose afirmar que la actividad enzimática depende de dos pKs con valores  $pK_1$   $6,8 \pm 0,04$  y  $pK_2$   $7,9 \pm 0,16$ . Debido a que ninguno de los sustratos o productos de la reacción presentan grupos ionizables a esos pKs (el pKa de la dCyd es 9,5, el pKa de la Ade es 3,9, el pKa de la dAdo es 9,8 y el pKa de la Cyt es 4,4), los valores obtenidos pertenecen a la forma de la enzima unida al sustrato; aunque es difícil asignar los valores de pKa a aminoácidos o grupos concretos, ya que pueden estar influenciados por el entorno que proporciona la proteína.

Respecto a la variación de la eficacia catalítica con el pH, los datos obtenidos no se han podido ajustar correctamente a la ecuación [7], lo que no ha permitido obtener los valores de pKs implicados en la unión del sustrato a la enzima libre.

#### 4.8. Estudios de inactivación térmica de *Bp*NDT

Los estudios de inactivación térmica se llevaron a cabo incubando la enzima durante 96 h a 40, 50, 60 y 70 °C según las condiciones descritas en el apartado 12.1 de Materiales y Métodos (Figura 50). Los estudios de inactivación térmica se ajustaron al modelo que propone la existencia de dos estados enzimáticos (E y E<sub>d</sub>), siendo  $k_d$  el coeficiente de desactivación de primer orden.

*Bp*NDT es estable a 40 y 50 °C durante al menos 96 h, mientras que a 60 °C la actividad disminuye con un coeficiente de desactivación  $k_d = 0,032 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de vida media  $t_{1/2} = 21,8 \text{ h}$ . La inactivación térmica a 70 °C sigue igualmente una desactivación exponencial simple, aunque la actividad disminuye más rápidamente, siendo  $k_d = 0,118 \text{ h}^{-1}$  y  $t_{1/2} = 5,9 \text{ h}$ .



**Figura 50.** Inactivación térmica de *Bp*NDT a 40 °C (●), 50 °C (▲), 60 °C (■) y 70 °C (◆). Después de la inactivación térmica, la enzima se incubó en hielo 5 min y se realizó el ensayo estándar para la síntesis de dAdo.

## 5. Caracterización estructural de *Bp*NDT

Para caracterizar estructuralmente la *Bp*NDT se llevó a cabo el cálculo del coeficiente de extinción molar, la determinación del estado de oligomerización de la enzima, de la temperatura de desnaturalización y la estructura secundaria y terciaria.

### 5.1. Cálculo del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ )

El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) se calculó mediante el método de Edelhoch (Edelhoch, 1967) (ecuación [2], apartado 11.4 de Materiales y Métodos).

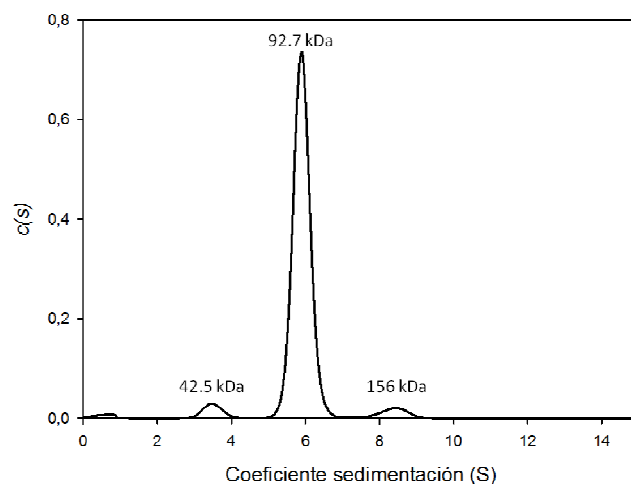
El coeficiente de extinción molar de la enzima desnaturalizada calculada a partir de la secuencia de aminoácidos a través del programa ProtParam es  $30940 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , mientras que el calculado experimentalmente es muy similar,  $29282 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### 5.2. Determinación de la masa molecular y estado de oligomerización de *Bp*NDT

Se llevaron a cabo estudios de ultracentrifugación analítica, velocidad y equilibrio de sedimentación, para determinar la masa molecular y el estado de oligomerización de *Bp*NDT.

Los experimentos de velocidad de sedimentación (apartado 11.5 de Materiales y Métodos) se emplearon para calcular la distribución de coeficientes de sedimentación  $c(s)$  a través del programa SEDFIT 12.52 (Brown et al, 2006); y la conversión de éstos a  $c(M)$  indicó la presencia de tres especies en la muestra, dos de ellas muy minoritarias, correspondientes a 42,5 kDa y 156 kDa (abundancia de 4,4 % y 4,3 % respectivamente), y una especie en mayor proporción, de 92,7 kDa y 91 % de abundancia, con un coeficiente de sedimentación de 5,9 S (Figura 51).

Además, para obtener un valor preciso de la masa molecular de la proteína se realizaron experimentos de equilibrio de sedimentación. A través del programa HETEROANALYSIS 1.1.44 (Cole, 2004) se determinó que la masa molecular promedio de *Bp*NDT es  $91400 \pm 400 \text{ Da}$ , compatible con un estado homohexamérico, ya que cada monómero tiene una masa molecular de 16398,5 Da (calculado a partir de la secuencia de aminoácidos).

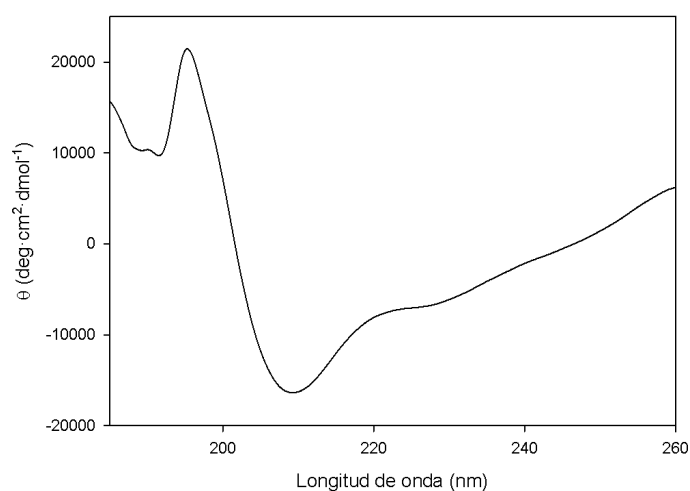


**Figura 51.** Variación de la distribución del coeficiente de sedimentación  $c(s)$  con el coeficiente de sedimentación (S). *Bp*NDT (0,36 mg/mL) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0.

### 5.3. Determinación de la estructura secundaria de *Bp*NDT

La estructura secundaria de la enzima se determinó tanto experimentalmente, mediante dicroísmo circular, como teóricamente, a través de programas informáticos de predicción de dicha estructura a partir de la secuencia de aminoácidos.

Se registró el espectro de dicroísmo circular de *Bp*NDT en la región del ultravioleta lejano (apartado 11.8 de Materiales y Métodos, figura 52), observándose un mínimo de elipticidad molar a 210 nm.



**Figura 52.** Espectro de DC (180-260 nm) de *Bp*NDT a 0,32 mg/mL en tampón fosfato potásico 5 mM pH 7,0.

A partir de los datos de elipticidad molar de *Bp*NDT se calculó la proporción de cada uno de los motivos de estructura secundaria mediante el programa CDNN V2.1 (Bohm et al, 1992). *Bp*NDT presenta 35,6 % de  $\alpha$ -hélice, 7,7 % de lámina  $\beta$  antiparalela, 8,3 % de lámina  $\beta$  paralela, 16,6 % de giros  $\beta$  y 31,6 % de estructura aperiódica (Tabla 14).

Paralelamente al dicroísmo circular se realizó la predicción de la estructura secundaria de *Bp*NDT a partir de su estructura primaria mediante 7 programas informáticos: Psipred, Jpred, SOPMA, HHpred, Swiss-model, Quark Ab-Initio e I-Tasser (apartado 11.9 de Materiales y Métodos).

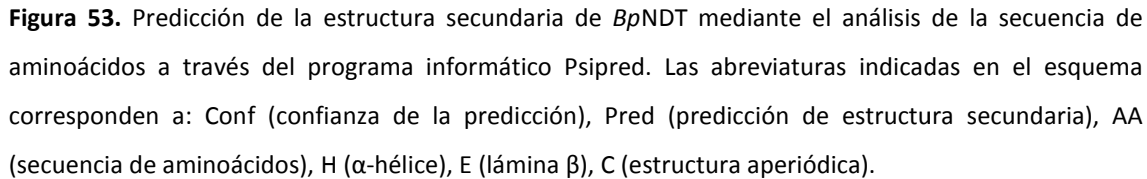
**Tabla 14.** Predicción de la estructura secundaria de *Bp*NDT en función del espectro de dicroísmo circular (DC) y de la secuencia de aminoácidos.

Motivo							Quark	
estructural	DC	Psipred	Jpred	SOPMA	HHpred	Swiss-model	Ab-Initio	I-Tasser
$\alpha$ -hélice	35.6	32.4	39.4	43.7	38.7	33.1	33.1	33.8
Lámina $\beta$	16	14.1	14.1	16.2	17.6	13.4	7.8	18.3
Giros $\beta$	16.6							
Aperiódica	31.6	53.5	46.5	40.2	43.7	53.5	59.2	47.9

Los resultados se presentan en porcentaje (%) de cada elemento estructural.

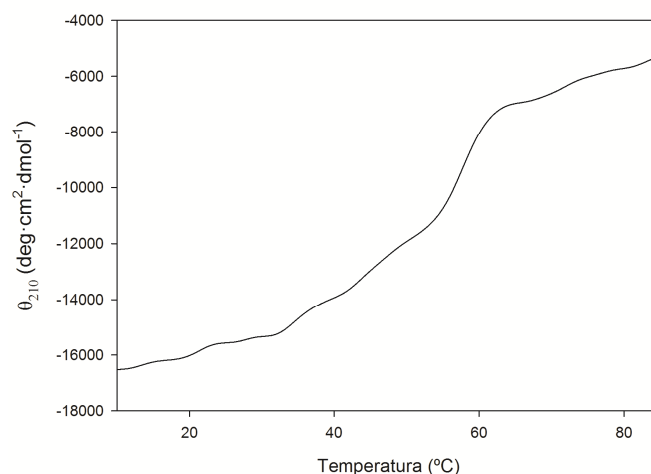
Como se muestra en la tabla 14, todas las predicciones teóricas coinciden con el dicroísmo circular en que *Bp*NDT tiene más regiones en estructura  $\alpha$ -hélice que lámina  $\beta$ , 36,2 % y 15,7 % respectivamente. La estructura secundaria reflejada por el servidor Quark es el que más difiere, asignando un mayor porcentaje a la estructura aperiódica.

Los elementos de estructura secundaria calculados a través del servidor Psipred a partir de la secuencia de aminoácidos se distribuyen del modo indicado en la figura 53.



En primer lugar, la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) es la temperatura a la cual el 50 % de la proteína se encuentra desplegada; un parámetro importante que está ligado a la función de la enzimas. Para determinar la temperatura de desnaturalización de *Bp*NDT se emplearon tres técnicas distintas: dicroísmo circular, calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía de fluorescencia.

116

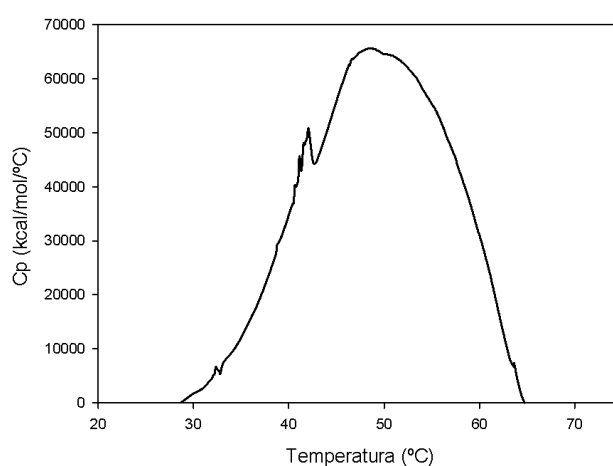


**Figura 54.** Variación de la elipticidad molar a 210 nm con la temperatura. Para llevar a cabo el experimento se empleó *Bp*NDT pura (0,32 mg/mL) en tampón fosfato potásico 5 mM pH 7,0.

El resultado de  $T_m$  obtenido mediante este método fue 58 °C, temperatura elevada para tratarse de una enzima procedente de un microorganismo psicrotolerante.

Por otro lado, la calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite la medición de la cantidad de calor que es liberada o absorbida por una muestra respecto a un blanco de referencia en base a un cambio de temperatura (Gill et al, 2010). Esta técnica permite determinar la temperatura de desnaturalización de las proteínas.

El seguimiento de la desnaturalización de *Bp*NDT se llevó a cabo incrementando la temperatura desde 15 hasta 90 °C (apartado 11.6 de Materiales y Métodos).



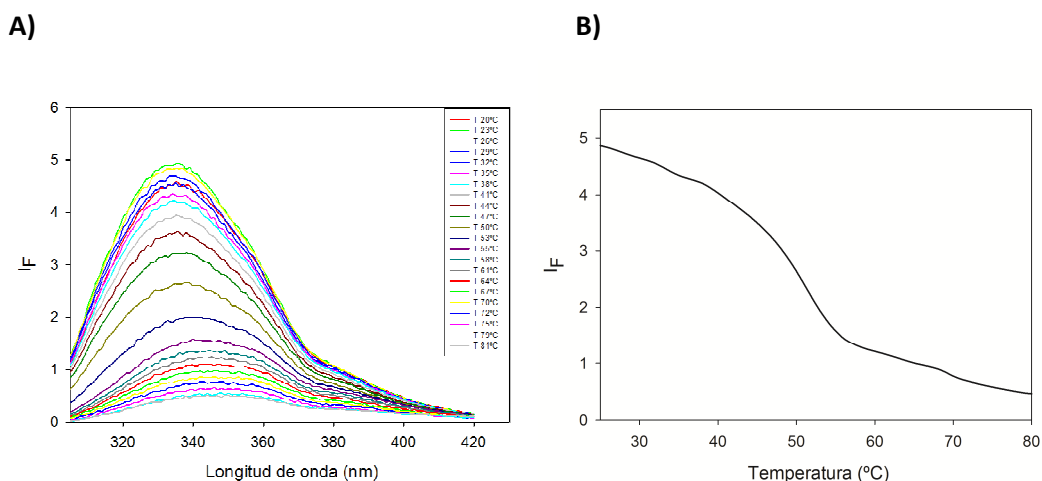
**Figura 55.** Variación de la capacidad calorífica con la temperatura. Para llevar a cabo el experimento de DSC se utilizó *Bp*NDT pura (0,36 mg/mL) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0.



Cuando la proteína alcanza su temperatura de desnaturalización se produce un pico endotérmico en la curva calorimétrica, que en este caso corresponde a 49,01 °C (Figura 55).

Finalmente, la espectroscopía de fluorescencia permite la determinación de la temperatura de desnaturalización de una proteína, al registrar el espectro de emisión de la misma a varias temperaturas.

Los espectros de fluorescencia de *Bp*NDT pura se registraron entre 20 y 80 °C empleando una  $\lambda_{exc}$  de 295 nm (apartado 11.7 de Materiales y Métodos). Como se puede observar en la figura 56, a medida que aumenta la temperatura, la intensidad de fluorescencia ( $I_F$ ) disminuye, manteniéndose en todos los casos el máximo de emisión, 335 nm. La representación de la  $I_F$  a 335 nm frente al valor de temperatura permitió el cálculo de la temperatura de desnaturalización de *Bp*NDT, 49 °C.



**Figura 56. A)** Espectros de fluorescencia de *Bp*NDT a distintas temperaturas (20-80 °C). **B)** Variación de la intensidad de fluorescencia ( $I_F$ ) a 335 nm con la temperatura. Los espectros se llevaron a cabo con *Bp*NDT pura (0,01 mg/mL) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0.

El valor de temperatura de desnaturalización, 49 °C, es el punto de inflexión de la curva representada en la figura 56B. El valor obtenido mediante esta técnica coincide con la temperatura de desnaturalización obtenida a partir del experimento de DSC, mientras que el obtenido mediante DC es 9 °C mayor. Las dos últimas técnicas son más precisas en cuanto a cálculo de temperatura de desnaturalización se refiere, ya que permiten la determinación de la pérdida de estructura terciaria, mientras que el dicroísmo circular permite el estudio de la estructura secundaria. Por ello se determinó 49 °C como *T<sub>m</sub>* de *Bp*NDT.

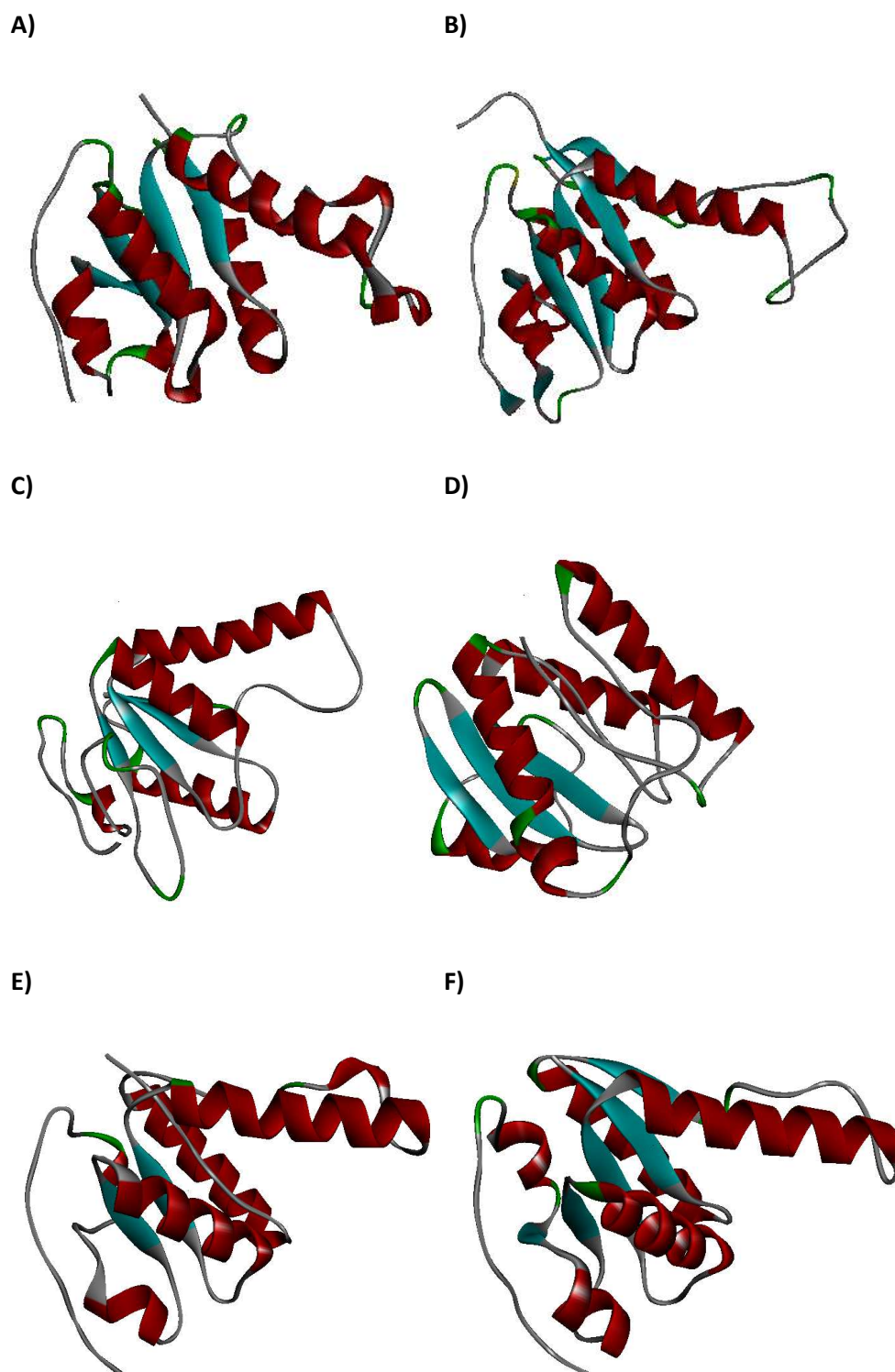
### 5.5. Modelado y estructura tridimensional de *Bp*NDT

La estructura terciaria de *Bp*NDT se determinó a través de diversos programas informáticos (apartado 11.10 de Materiales y Métodos), que generaron diferentes modelos tridimensionales de *Bp*NDT. Se emplearon como estructuras de referencia las NDTs cristalizadas cuya secuencia es más similar a la de *Bp*NDT, la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo II de *Lactobacillus leichmannii* (PDB 1F8Y) y la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo I de *Lactobacillus helveticus* (PDB 1S2G). En la figura 57 se representan los modelos obtenidos con cada uno de los servidores.

Las dos estructuras empleadas como referencia presentan 4-5 láminas  $\beta$  flanqueadas por 4 estructuras  $\alpha$ -hélice. El modelo de *Bp*NDT generado mediante HHpred presenta 5 láminas  $\beta$  que se encuentran en una región central rodeada por otras 5  $\alpha$ -hélice. En los otros modelos el número de láminas  $\beta$  disminuye a 4 (Swiss-model), 3 (Quark Ab-Initio) o 2 (I-Tasser).

El modelo que menos se parece a los demás es el generado mediante Quark Ab-Initio, lo cual concuerda con los datos obtenidos para estructura secundaria mediante el mismo programa, donde asignaba una mayor proporción de estructura aperiódica (apartado 5.3 de Resultados).

Además, el servidor I-Tasser también predice el sitio de unión del sustrato a la NDT. Según el programa estarían implicados en la unión del sustrato los residuos Ala<sup>7</sup>, Ser<sup>8</sup>, Pro<sup>36</sup>, Arg<sup>37</sup>, Asp<sup>59</sup>, Val<sup>55</sup>, Asp<sup>79</sup>, Gly<sup>81</sup> y Glu<sup>85</sup>.



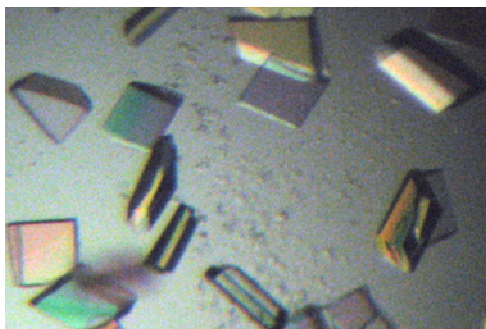
**Figura 57.** Estructura de un monómero de A) *LINDT* (PDB 1F8Y) y B) *LhPDT* (PDB 1S2G). Modelos de estructura terciaria de *BpNDT* obtenidos a partir de los servidores C) Swiss-model D) Quark Ab-Initio E) I-Tasser F) HHPred. Los elementos de estructura secundaria se representan en modelo de lazo:  $\alpha$ -hélice (rojo), lámina  $\beta$  (azul), giros  $\beta$  (verde), estructura aperiódica (gris).

## 5.6. Cristalización de *Bp*NDT

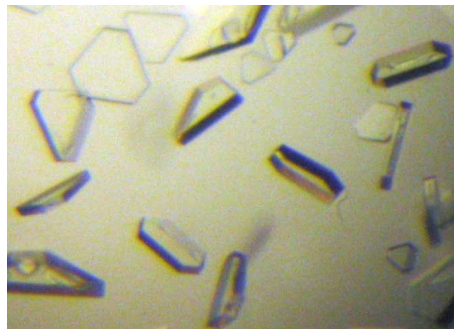
Para completar la información sobre la estructura cuaternaria de *Bp*NDT, se llevó a cabo la cristalización de la enzima en el grupo de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto Rocasolano, bajo la dirección del Dr. José Miguel Mancheño.

El proceso de cristalización de *Bp*NDT y la difracción de rayos X del cristal obtenido se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 17.1 y 17.2 de Materiales y Métodos. La enzima pura se concentró hasta 9-10 mg/mL para realizar los experimentos iniciales de cristalización, a escala de nanolitro. Tres días después de realizar dichos experimentos, aparecieron cristales en 14 condiciones distintas (Tabla 15). Todas ellas se escalaron a volúmenes mayores, microlitros, primero utilizando soluciones comerciales y después con soluciones preparadas en el laboratorio. Este paso permitió la preparación de cristales de mayores dimensiones (dimensión máxima: 0,2-0,3 mm) en tres condiciones (Tabla 15, figura 58).

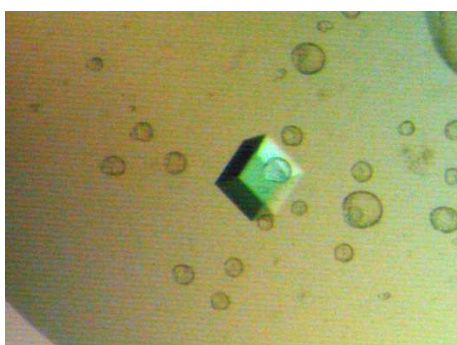
A)



B)



C)



**Figura 58.** Cristales óptimos de *Bp*NDT recombinante crecidos a 18 °C en **A)** 30 % (p/v) PEG 3350, Bis-Tris 0,1 M, pH 6,5, cloruro cálcico 0,05 M; **B)** 20 % (p/v) PEG 3350, Bis-Tris 0,1 M, pH 6,5, cloruro sódico 0,05 M; **C)** nitrato sódico 3 M, acetato sódico 0,1 M, pH 4,6. En todos los casos la relación proteína:precipitante utilizada fue 1:2. (Volumen final de la gota 3  $\mu$ L).

**Tabla 15.** Condiciones de cristalización para *Bp*NDT.

Pantalla	Condiciones iniciales	Condiciones óptimas
<i>Crystal screen HT</i> <sup>1</sup>	30 % (p/v) PEG 8,000	
	Cacodilato sódico 0.1 M, pH 6.5	
	Acetato sódico 0.2 M	
	20 % (v/v) 2-Propanol	
	Acetato sódico 0.1 M, pH 4.6	
<i>Index HT</i> <sup>1</sup>	Cloruro cálcico 0.2 M	
	Cloruro sódico 3 M	
	Acetato sódico 0.1 M, pH 4.5	
	30 % (p/v) PEG 550	30 % (p/v) PEG 3350
	Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5	Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5
	Cloruro cálcico 0.05 M	Cloruro cálcico 0.05 M (1:2)*
	25 % (p/v) PEG 3350	20 % (p/v) PEG 3350
	Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5	Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5
	Cloruro sódico 0.2 M	Cloruro sódico 0.05 M (1:2)*
	25 % (p/v) PEG 3350,	
	Sulfato amónico 0.2M	
	Bis-Tris 0.1 M, pH 5.5	
<i>JBS Classic</i> <sup>2</sup>	Cloruro de litio 0.8 M	
	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	
<i>JCSG</i> <sup>3</sup>	DL-ácido málico 2.1 M, pH 7.0	
	Citrato sódico 1.6 M	
<i>PACT</i> <sup>3</sup>	20 % (p/v) PEG 6000,	
	Acetato sódico 0.1 M, pH 5.0	
	Cloruro sódico 0.2 M	
	20 % (p/v) PEG 6000	
	MES 0.1 M pH 6.0	
<i>SaltRX HT</i> <sup>1</sup>	Cloruro cálcico 0.2 M	
	Fosfato amónico dibásico 2.4 M	
	Tris 0.1 M, pH 8.5	
	Nitrato sódico 1.5 M	Nitrato sódico 3.0 M
	Acetato sódico 0.1 M, pH 4.6	Acetato sódico 0.1 M, pH 4.6 (1:2)*
	Nitrato sódico 4.0 M	Nitrato sódico 3.0 M
	Acetato sódico 0.1 M, pH 4.6	Acetato sódico 0.1 M, pH 4.6 (1:2)*

<sup>1</sup>Hampton Research; <sup>2</sup>Jena Bioscience; <sup>3</sup>Qiagen; \*relación proteína:precipitante (v/v).

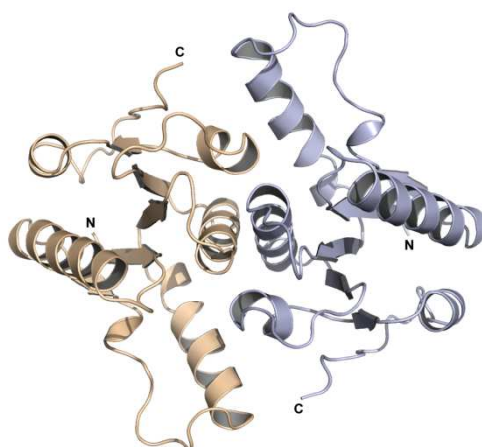
Los datos de difracción, recogidos a  $-153\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un detector mar345dtb *Image Plate* empleando rayos-X Cu  $K\alpha$  generados por un ánodo rotatorio *Microstar* (Brüker, Estados Unidos), revelaron la baja difracción de los cristales preparados en PEG (condiciones A y B), independientemente del crioprotector empleado ( $4,5\text{ }\text{\AA}$  de resolución), y la difracción de hasta  $3\text{ }\text{\AA}$  de los cristales preparados en nitrato sódico  $3\text{ M}$ , acetato sódico  $0,1\text{ M}$ , pH  $4,6$  (condición C). Por tanto, se eligieron los cristales obtenidos en la condición C para ser analizados mediante radiación de sincrotrón.

El análisis de los datos de difracción obtenidos de las líneas de luz ID23-2 e ID29 en el ESRF (Grenoble, Francia) con *XDS* (Kabsch, 2010) revelaron que los cristales de *Bp*NDT pertenecían al grupo espacial trigonal *R3*, con parámetros de celda unitaria  $a = b = 107,72$ ,  $c = 63,87\text{ }\text{\AA}$ , y  $a = b = 107,54$ ,  $c = 62,12\text{ }\text{\AA}$ .

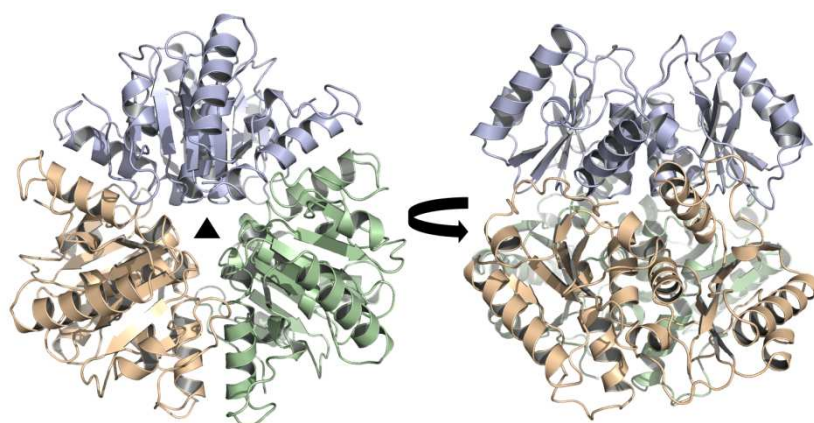
Los resultados de los test-L (Padilla et al, 2003) para hermanamiento merohedral llevado a cabo con *TRUNCATE* (Winn et al, 2011) y *phenix.xtriage* (Adams et al, 2010) indicaron que no existía hermanamiento en los datos de difracción recolectados de la línea de luz ID23-2, mientras que en los datos obtenidos de la línea ID29 sí identificaron la existencia de hermanamiento merohedral.

La estructura de *Bp*NDT se obtuvo mediante reemplazo molecular empleando como modelo las coordenadas atómicas de la purina 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus helveticus* (PDB 1s2d; 29 % de identidad de secuencia) (Anand et al, 2004). Como se observa en la figura 59 A, la unidad asimétrica está constituida por dos cadenas polipeptídicas de *Bp*NDT que se ensamblan formando un dímero. Además, tres de estos dímeros se asocian alrededor de un eje cristalográfico terciario, formando un hexámero que se puede describir como un trímero de dímeros (figura 59 B), donde el centro activo está constituido por aminoácidos de dos subunidades que se orientan de forma opuesta. Este ensamblaje oligomérico se ha observado también en la NDT de *L. leichmannii* (Armstrong et al, 1996) o en la PDT de *L. helveticus* (Anand et al, 2004), a diferencia de la NDT de *D. psychrophila* y la NDT de *L. lactis* sp. *lactis* que se disponen de forma tetramérica (Alfaro-Ureña, 2012; Yukiko et al, 2007).

A)

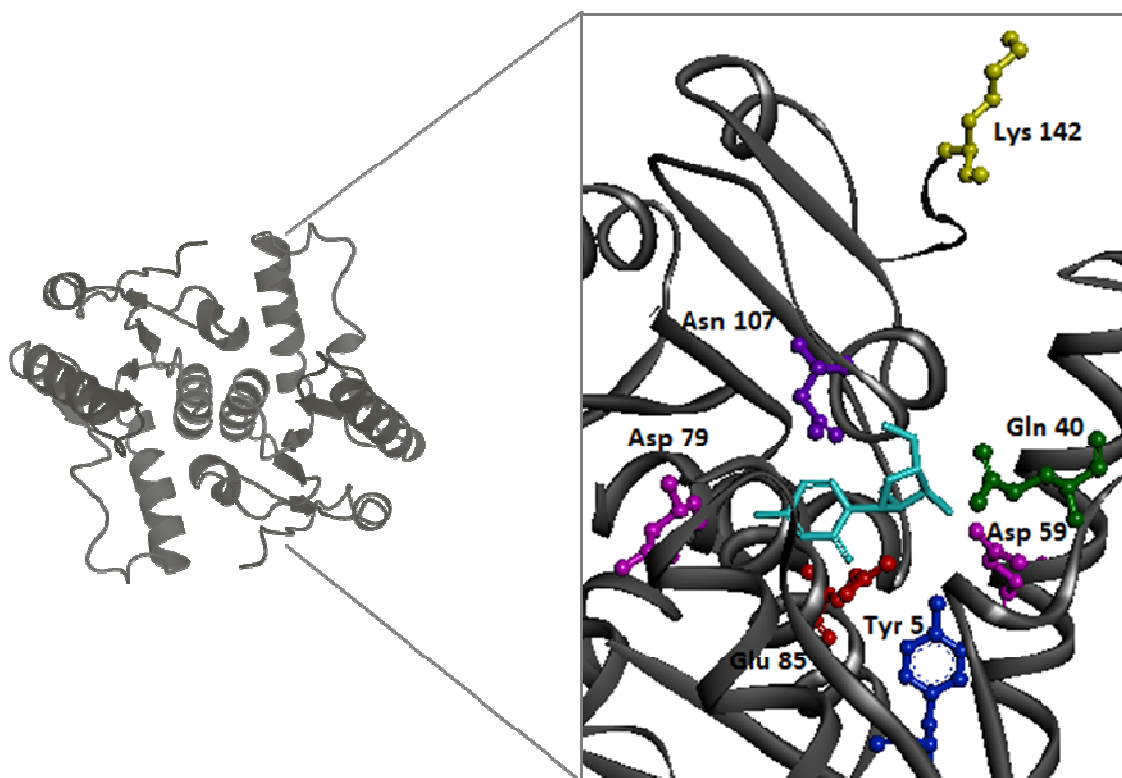


B)



**Figura 59.** Unidad asimétrica del cristal trigonal de *BpNDT* y estructura asimétrica de la enzima. **A)** Dos cadenas polipeptídicas de *BpNDT* forman la unidad asimétrica del cristal trigonal de *BpNDT* (cada una de las cadenas se representa de un color) **B)** Estructura hexamérica de *BpNDT*. Los tres dímeros se disponen en relación al eje ternario (▲). Se muestran dos vistas ortogonales del hexámero, en el que cada dímero se muestra de un color distinto. La figura se representó empleando el programa PyMol (DeLano, 2002).

En la figura 60 se representa uno de los dos centros activos presentes en un dímero en base a los residuos identificados en otras NDTs, en el que participan aminoácidos de las dos cadenas polipeptídicas. La Tyr<sup>5</sup>, Gln<sup>40</sup>, Asp<sup>59</sup>, Asp<sup>79</sup> y Glu<sup>85</sup> pertenecen a una cadena, mientras que la Asn<sup>107</sup> y la Lys<sup>142</sup> a la otra, orientada de forma antiparalela.



**Figura 60.** Representación de uno de los centros activos de un dímero de *BpNDT*. Los aminoácidos que forman parte del centro activo se representan según el modelo de palos y bolas y se diferencian por colores: Asp (rosa), Asn (violeta), Gln (verde), Tyr (azul oscuro), Glu (rojo), Lys (amarillo). El sustrato, 2'-desoxiuridina, se muestra en azul claro. La figura se representó empleando el programa Discovery Studio 4.0 (Accelrys Software Inc.).

## 6. Identificación de los residuos del centro activo de *BpNDT* mediante mutagénesis dirigida

Para determinar el grado de participación de los aminoácidos presentes en el centro activo de *BpNDT* en su actividad catalítica, teniendo en cuenta su estructura y los residuos de otras NDTs descritas (Armstrong et al, 1996), se llevaron a cabo mutaciones puntuales sobre los mismos. En primer lugar, para facilitar la purificación de los mutantes, se clonó en pET28a(+) el gen *Bpndt* con una secuencia que codifica 6 histidinas en el extremo 5' (*BpNDT*<sub>6his</sub>).

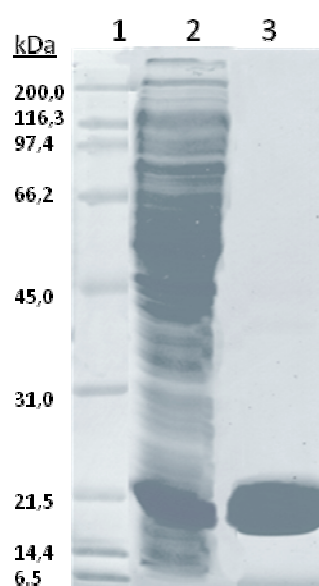
### 6.1. Producción y purificación de *BpNDT* marcada con etiqueta de histidinas

El gen *Bpndt-6his* se amplificó mediante PCR empleando los oligonucleótidos BpHisNcoI y BpsecEcoRI, se clonó en el plásmido pET28a(+), obteniendo la construcción pET28a(+)-*Bpndt-6his* y se expresó según el protocolo descrito en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos. El



análisis mediante PAGE-SDS del extracto y residuos celulares tras la sonicación de las células de *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*Bpndt-6his* recombinantes, procedentes de 750 mL de caldo de cultivo, determinó que *BpNDT-6His* se produce de forma soluble (Figura 61) y la purificación de la proteína se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en una columna de Níquel-agarosa (apartado 9.3 de Materiales y Métodos).

Se obtuvo la enzima pura a homogeneidad en un solo paso con una producción de 21.6 mg de enzima pura por L de caldo de cultivo.



**Figura 61.** PAGE-SDS en geles de poliacrilamida 15 % de la purificación de *BpNDT-6His*. 1- Marcadores de masa molecular *Broad Range* (Bio-Rad, Estados Unidos); 2- Extracto celular después de la sonicación; 3- *BpNDT-6His* pura después de la cromatografía de afinidad.

Para determinar si la presencia de la etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal de *BpNDT* afectaba a la actividad, se llevó a cabo la reacción estándar descrita en el apartado 10.2 de Materiales y Métodos con *BpNDT* y *BpNDT-6His*. En ambos casos se incubaron 0,4 µg de enzima pura con 2'-desoxiuridina y adenina 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8 en un volumen final de 40 µL. La actividad específica de *BpNDT* y *BpNDT-6His* fue 40 UI/mg y 48,6 UI/mg respectivamente, por lo que se concluye que la etiqueta de 6 histidinas no afecta a la actividad de la enzima, pudiendo por tanto utilizar esta enzima recombinante para abordar los estudios de mutagénesis dirigida. Este método permite obtener la enzima pura mediante un protocolo más sencillo y rápido, lo que facilita estos estudios. Además, también se analizó la posible interferencia de esta etiqueta en la estructura de la enzima en base a su estructura

cuaternaria (estudios de cristalografía), determinándose que la presencia de las 6 histidinas no interfiere en la estructura del centro activo.

## 6.2. Mutagénesis dirigida de *BpNDT* con etiqueta de histidinas

Una vez comprobado el mantenimiento de la actividad de *BpNDT*-6His, se realizaron mutaciones puntuales sobre los residuos que podrían tener una función análoga a los aminoácidos que en otras NDTs forman parte del centro activo. En la NDT de *Lactobacillus leichmannii* (LINDT) (Armstrong et al, 1996) se propusieron como aminoácidos implicados en catálisis el Asp<sup>92</sup> y Asn<sup>123</sup>, para la unión de la desoxirribosa, el Asp<sup>72</sup> y Gln<sup>46</sup>, para la correcta estabilización y orientación de la base, y el residuo catalítico Glu<sup>98</sup>, estabilizado mediante puente de hidrógeno por la Tyr<sup>7</sup> (Fresco-Taboada et al, 2013a).

De acuerdo con el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *BpNDT* con las NDTs descritas (Figura 38) y en base a la estructura cuaternaria obtenida mediante cristalografía, se estableció que los residuos que podrían conformar el centro activo son Tyr<sup>5</sup>, Gln<sup>40</sup>, Asp<sup>59</sup>, Asp<sup>79</sup>, Glu<sup>85</sup>, Asn<sup>107</sup>; no localizándose una tirosina terminal. Estos aminoácidos fueron sustituidos por otros con alguna característica común (longitud, aromaticidad, carga) o totalmente opuestos, mientras que la Lys C terminal se sustituyó por una Tyr, una Gly o fue delecionada.

Las mutaciones se llevaron a cabo mediante el *Quickchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Estados Unidos) empleando el plásmido pET28a(+)-*Bpndt-6his* como DNA molde para realizar la amplificación mediante PCR (apartado 18 de Materiales y Métodos). Tras la expresión en *E. coli* BL21 (DE3) y la purificación mediante cromatografía de afinidad en columna de Níquel-agarosa de los diferentes mutantes de *BpNDT*-6His, se determinó la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de cada uno de ellos mediante el ensayo estándar (apartado 10.1 de Materiales y Métodos).

**Tabla 16.** Actividad desoxirribosiltransferasa de los mutantes de *BpNDT*-6His obtenidos.

Mutación	Ninguna	Y5F	Y5H	Q40E	Q40K	D59N	D59H	D79N	D79H
Actividad residual (%)	100	1,17	1,38	0	5,91	15,8	0	0	0
Mutación	Ninguna	E85D	E85Q	E85H	N107D	N107H	K142Y	K142G	ΔK142
Actividad residual (%)	100	0	0	0	0	2,12	97,7	90,4	1,5

Condiciones de reacción: 0,40 µg de enzima se incubaron a 40 °C durante 5 min con 40 µl de 2'-dUrd y Ade 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8.

Como se puede observar en la tabla 16, en la mayoría de las mutaciones se pierde totalmente la actividad, indicando que todos los residuos descritos como pertenecientes al centro activo en *L/NDT* son también importantes para la catálisis en *BpNDT*. En el caso de la Lys C terminal, su sustitución por una Gly o Tyr no afecta a la misma, mientras que su delección sí produce pérdida de actividad, por lo que el grupo carboxilo de ese aminoácido es el que contribuye a la eficacia catalítica de la enzima (Short et al, 1996).

## 7. Inmovilización de *BpNDT*

La aplicación a escala industrial de las enzimas en forma soluble se encuentra limitada por la inestabilidad de la proteína en condiciones no fisiológicas, así como por la gran dificultad de reciclar la enzima para llevar a cabo más de una reacción. Por el contrario, las enzimas inmovilizadas permiten su reutilización y, en general, el proceso de inmovilización aumenta la estabilidad de dichas enzimas (Terreni et al, 2008). Por ello, se abordó la inmovilización de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus* para permitir su reciclado y obtener análogos de nucleósidos con actividad terapéutica.

La preparación de un biocatalizador de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus* se llevó a cabo a través de dos estrategias de inmovilización, la unión covalente a glioxil-agarosa y la adsorción iónica a soportes funcionalizados con polietilenimina (PEI) seguida de técnicas de estabilización. El primer soporte, la glioxil-agarosa, se ha empleado satisfactoriamente para crear biocatalizadores estabilizados a través de uniones covalentes multipuntuales de la enzima al soporte (Mateo et al, 2006a). Por otro lado, los soportes funcionalizados con PEI se han empleado para la inmovilización de enzimas multiméricas, seguida de entrecruzamiento con dextrano aldehídico para evitar la disociación de las subunidades y la consecuente desactivación de la enzima y contaminación del producto (Fernández-Lafuente, 2009).

### 7.1. Inmovilización covalente en glioxil-agarosa

La inmovilización covalente de *BpNDT* sobre glioxil-agarosa se llevó a cabo a dos temperaturas (25 °C o 4 °C) y a pH 10. Además, en algunos casos se añadió 2'-desoxiuridina para evitar la inmovilización a través de residuos del centro activo (apartado 19.1 de Materiales y Métodos). En condiciones alcalinas, pH 10, la inmovilización se produce entre los grupos aldehído del

soporte y los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas de la proteína. Los enlaces imino formados son bases de Schiff débiles que son reducidos a enlaces C-N mediante la adición de  $\text{NaBH}_4$ .

Como se puede observar en la tabla 17, *Bp*NDT se unió al soporte en todos los casos, disminuyendo el rendimiento en presencia del agente protector del centro activo. Sin embargo, la actividad del derivado obtenido fue nula, con excepción de la inmovilización realizada a 4 °C en ausencia de dUrd, aunque después de la reducción sólo se consiguió retener un 2,6 % de actividad.

**Tabla 17.** Inmovilización covalente de *Bp*NDT en glioxil-agarosa.

Actividad inicial por gramo de glioxil-agarosa (UI / g)	Condiciones de inmovilización	Enzima inmovilizada (%) <sup>a</sup>	Actividad (UI/g soporte)	Actividad después de la reducción con $\text{NaBH}_4$ (UI/g soporte); % <sup>b</sup>
8,6	25°C	55,9	0	0; 0
8,6	4°C	44,7	1,0	0,22; 2,6
8,6	25°C + dUrd <sup>c</sup>	33,8	0	0; 0
8,6	4°C + dUrd <sup>c</sup>	27,0	0	0; 0

<sup>a</sup> Cantidad relativa de enzima unida al soporte respecto a la cantidad de enzima inicial antes del proceso de inmovilización; <sup>b</sup> Actividad relativa del derivado inmovilizado con respecto a la actividad de la enzima soluble; <sup>c</sup> Adición de 2'-desoxiuridina como agente protector durante la inmovilización.

Al igual que sucede con *Bp*NDT, al inmovilizar sobre glioxil-agarosa dos nucleósido fosforilasas, la uridina fosforilasa de *Bacillus subtilis* (*BsPyNP*) (Rocchietti et al, 2004) y la timidina fosforilasa de *E. coli* (*EcTP*) (Serra et al, 2011), se obtuvieron altos rendimientos de inmovilización pero se produjo la total inactivación de la enzima.

Finalmente, aunque la adición de un inhibidor o sustrato a la mezcla de inmovilización puede prevenir la distorsión de la estructura de la enzima que se produce a causa de la interacción con el soporte activado (Serra et al, 2013b), el rendimiento de inmovilización disminuyó cuando se llevó a cabo la inmovilización en presencia de dUrd a ambas temperaturas. En el caso de la purina nucleósido fosforilasa de *Bacillus subtilis* (*BsPNP*), se añadió inosina para incrementar la estabilidad de esta enzima multimérica durante el proceso, pero no se logró la unión de la enzima a la glioxil-agarosa (Rocchietti et al, 2004).

## 7.2. Inmovilización de *Bp*NDT en soportes funcionalizados con polietilenimina

Con el objetivo de mantener la estructura cuaternaria de *Bp*NDT intacta y preservar su actividad, se llevó a cabo la inmovilización de la enzima mediante adsorción iónica sobre soportes recubiertos con PEI. La PEI ramificada presenta un gran número de grupos amino que

pueden interaccionar iónicamente con los grupos aniónicos localizados en la superficie de la enzima (grupos carboxilo de ácido aspártico y glutámico) (Bolívar et al, 2009). En este caso se emplearon como soportes Sepabeads EC-EP y glioxil-agarosa funcionalizados con PEI (MM 600 Da) para la inmovilización de *Bp*NDT a 25 °C y pH 7,5 (apartado 19.2 de Materiales y Métodos).

**Tabla 18.** Inmovilización de *Bp*NDT en soportes funcionalizados con PEI (MM 600 Da).

Actividad inicial por gramo de soporte (UI / g)	Soporte funcionalizado con PEI	Enzima inmovilizada (%) <sup>a</sup>	Actividad (UI/g soporte); % <sup>b</sup>
12,0	Sepabeads-PEI	100	11,8; 98,0
11,3	Agarosa-PEI	100	11,3; 100

<sup>a</sup> Cantidad relativa de enzima unida al soporte respecto a la cantidad de enzima inicial antes del proceso de inmovilización; <sup>b</sup> Actividad relativa del derivado inmovilizado con respecto a la actividad de la enzima soluble.

Independientemente de la naturaleza del soporte empleado se inmovilizó la totalidad de la enzima después de 1 h de incubación, manteniéndose la actividad (Tabla 18). De forma similar, la *Bs*PyNP trimérica (Rocchietti et al, 2004) y la *Ec*TP dimérica (Serra et al, 2011) fueron inmovilizadas en Sepabeads activado con PEI, obteniendo una actividad final mayor al 85 % respecto a la actividad inicial.

Sin embargo, cuando la inmovilización de biocatalizadores se lleva a cabo mediante adsorción iónica a soportes cargados se puede producir la desorción de la proteína, causando la contaminación del producto. Para evitar la posible liberación de la enzima del soporte se pueden aplicar técnicas de post-inmovilización (Fernández-Lafuente et al, 1999), como el entrecruzamiento empleando dextrano activado con grupos aldehído. Para el entrecruzamiento de *Bp*NDT inmovilizada se utilizó dextrano de dos masas moleculares distintas (20 y 100 kDa) con diversos grados de oxidación, y en algunos casos se añadieron aditivos, dUrd o glicerol, para proteger el centro activo y estabilizar la enzima (apartado 19.2.1 de Materiales y Métodos). La densidad de grupos aldehído presente en el dextrano es mayor cuanto mayor es el grado de oxidación del mismo, conllevando a la formación de múltiples bases de Schiff entre el polímero y la enzima inmovilizada, que al ser reducidas con NaBH<sub>4</sub> incrementan la rigidez y afectan a la conformación de la enzima (Fernández-Lafuente et al, 1999; Ubiali et al, 2004).

Como se muestra en la tabla 19, el proceso de post-inmovilización disminuye la actividad del biocatalizador inmovilizado comparado con la enzima absorbida sobre el soporte recubierto

con PEI (Tabla 18). Tanto el aumento del grado de oxidación del dextrano como el incremento del tiempo de entrecruzamiento conducen a una mayor disminución en la actividad final del derivado, probablemente por la distorsión de la conformación de la enzima al aumentar el número de enlaces entre soporte y enzima.

**Tabla 19.** Inmovilización de *Bp*NDT sobre soportes funcionalizados con PEI y entrecruzamiento con dextrano.

Derivado	Actividad inicial por gramo de soporte (UI)	Soporte	MM dextrano (kDa); oxidación (%)	Tiempo entrecruzamiento (aditivo)	Actividad final (UI/g soporte); % <sup>a</sup>
1	12,0	Sepabeads-PEI	20; 20	1h	2,2; 18,7
2	6,1	Agarosa-PEI	20; 20	1h	2,3; 37,9
3	6,1	Agarosa-PEI	20; 50	1h	2,2; 36,8
4	6,1	Agarosa-PEI	20; 50	2h	2,0; 32,7
5	6,1	Agarosa-PEI	20; 50	4h	0,3; 4,6
6	8,7	Agarosa-PEI	20; 70	1h	1,8; 21,1
7	8,7	Agarosa-PEI	20; 70	2h	0,5; 5,5
8	8,7	Agarosa-PEI	20; 70	4h	0,3; 3,8
9	8,7	Agarosa-PEI	20; 70	1h (dUrd)	1,1; 13,3
10	8,7	Agarosa-PEI	20; 70	1h (glicerol)	2,8; 32,8
11	8,7	Agarosa-PEI	100; 20	1h	4,6; 53,1
12	6,1	Agarosa-PEI	100; 50	1h	0,2; 2,9
13	6,1	Agarosa-PEI	100; 70	1h	0,25; 4,2

<sup>a</sup>Actividad relativa del derivado inmovilizado con respecto a la actividad de la enzima soluble.

En general, los resultados fueron mejores cuando el dextrano empleado fue 20 kDa y el tiempo de entrecruzamiento no superó 1h; aunque cabe resaltar la actividad del derivado obtenido con dextrano 100 kDa, 20 % de oxidación. Respecto a la adición de agentes protectores del centro activo o estabilizadores de *Bp*NDT, la actividad del biocatalizador entrecruzado con dextrano 20 kDa y oxidado al 70 % se redujo en presencia de dUrd (Tabla 19, derivado nº 9 frente a nº 6), dato que concuerda con el resultado obtenido en la inmovilización covalente. En cambio, la adición de glicerol 20 % (v/v) ayudó a preservar la actividad del derivado, aumentando la actividad final en 1 UI/mg respecto a la obtenida en las mismas condiciones sin aditivo (derivado nº 10 frente al nº 6).

Los dos derivados con mayor actividad obtenidos fueron *Bp*NDT inmovilizada en agarosa-PEI 600 Da y entrecruzada con dextrano 20 kDa oxidado al 70 % en presencia de glicerol 20 % (v/v) y *Bp*NDT inmovilizada en agarosa-PEI 600 Da y entrecruzada con dextrano 100 kDa oxidado al 20 %.

### 7.3. Estudio de estabilidad de los derivados de *Bp*NDT inmovilizada

Con el fin de escoger uno de los derivados obtenidos para llevar a cabo la síntesis de nucleósidos no naturales, se estudió la estabilidad a 25 °C de los diferentes biocatalizadores en tampón carbonato potásico 100 mM pH 10,0 o en tampón HEPES 50 mM pH 8,0 con 20 % de dimetilformamida (DMF). El estudio de la estabilidad de los distintos derivados en ambas condiciones se realizó según la metodología del apartado 19.4 de Materiales y Métodos.

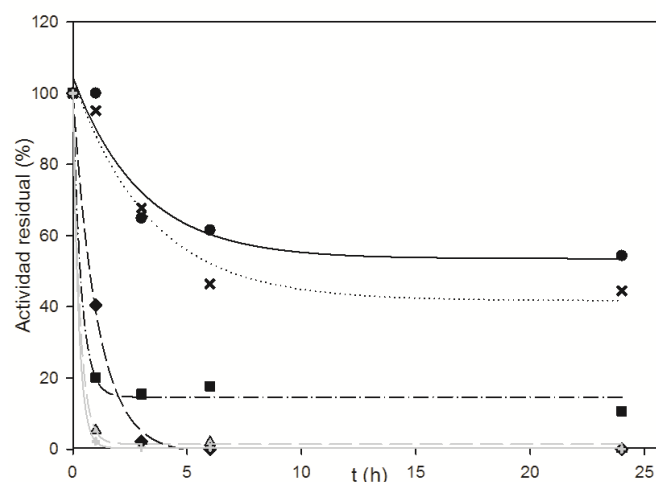
#### 7.3.1. Estabilidad a pH 10

El pH alcalino incrementa la solubilidad de nucleósidos y bases sin afectar a su estabilidad química, por lo que puede ser una condición favorable para llevar a cabo reacciones de transglicosilación empleando altas concentraciones de sustrato sin recurrir al uso de solventes orgánicos (Serra et al, 2011).

Varias nucleósido fosforilasas, como *Ec*TP (Serra et al, 2011) o *Bs*PyNP (Rocchietti et al, 2004), pierden totalmente su actividad al ser incubadas a pH 10, estabilizándose al ser inmovilizadas en Sepabeads PEI con dextrano oxidado al 20 %.

En estas condiciones *Bp*NDT libre retiene el 60 % de actividad después de 24 h de incubación (Figura 62). Tanto el biocatalizador generado únicamente por interacción iónica como el entrecruzado con dextrano 100 kDa pierden totalmente su actividad después de una hora de incubación. La estabilidad aumenta considerablemente en los derivados entrecruzados con dextrano 20 kDa; aumentando la actividad residual cuanto mayor es el grado de oxidación del dextrano, ya que se aumenta el número de enlaces entre el polímero y la enzima inmovilizada, y por tanto la rigidez del derivado final.

Únicamente el derivado entrecruzado con dextrano 20 kDa, 70 % de oxidación presenta una estabilidad similar a la de la enzima libre, manteniendo un 50 % de actividad a las 24 h.



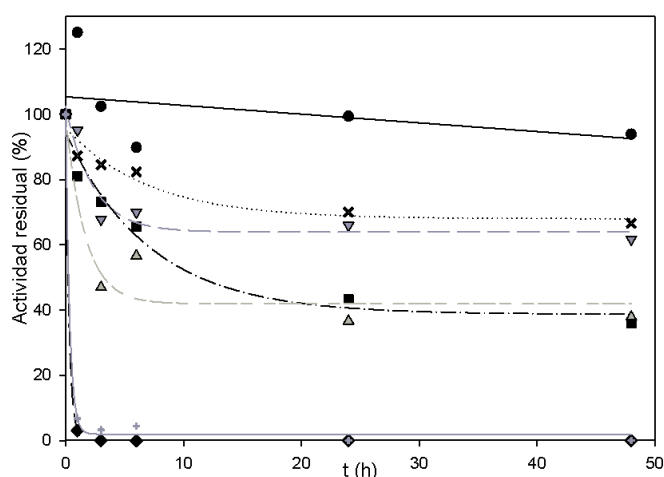
**Figura 62.** Estabilidad de *BpNDT* a pH 10. ● *BpNDT* libre; × *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da dextrano 20 kDa 70 % oxidación; ■ *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da dextrano 20 kDa 50 % oxidación; ▲ *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da dextrano 20 kDa 20 % oxidación; ◆ *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da dextrano 100 kDa 20 % oxidación; + *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da.

### 7.3.2. Estabilidad en dimetilformamida 20 %

El pH alcalino puede no ser suficiente para alcanzar concentraciones elevadas (g de producto por litro de reacción) de nucleobases y nucleósidos, por lo que debe añadirse una pequeña proporción de solvente orgánico como acetonitrilo o dimetilformamida. La dimetilformamida (DMF) es un solvente comúnmente utilizado en las reacciones de síntesis preparativa de nucleósidos (Serra et al, 2013a), ya que, con excepción de los derivados 5-fluoro, los nucleósidos y bases con grupos halogenados son muy poco solubles en medio acuoso, lo que supone un impedimento a la hora de escalar industrialmente el proceso de transglicosilación.

Las fosforilasas *BsPyNP* y *EcTP*, tanto en forma soluble como inmovilizadas en Sepabeads PEI 600 Da dextrano 20 kDa 20 % oxidado, toleran la presencia de DMF 20 % durante al menos 24 h (Serra et al, 2013a). *BpNDT* libre mantiene la totalidad de su actividad después de 48 h de incubación en tampón HEPES 50 mM pH 8,0 con 20 % de DMF (Figura 63). Por el contrario, al igual que sucedía al incubar a pH 10, tanto el biocatalizador generado únicamente por interacción iónica como el entrecruzado con dextrano 100 kDa pierden totalmente su actividad. La estabilidad aumenta en los derivados entrecruzados con dextrano 20 kDa a medida que aumenta el grado de oxidación del dextrano, aunque en ningún caso se alcanza la actividad retenida por *BpNDT* soluble.





**Figura 63.** Estabilidad de *BpNDT* en HEPES 50 mM pH 8, 20 % de dimetilformamida. ● *BpNDT* libre; × *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da dextrano 20 kDa 70 % oxidación (glicerol); ▼ *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da dextrano 20 kDa 70 % oxidación; ■ *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da dextrano 20 kDa 50 % oxidación; ▲ *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da dextrano 20 kDa 20 % oxidación; ◆ *BpNDT* inmovilizada en agarosa PEI 600 Da dextrano 100 kDa 20 % oxidación; + Agarosa PEI 600 Da.

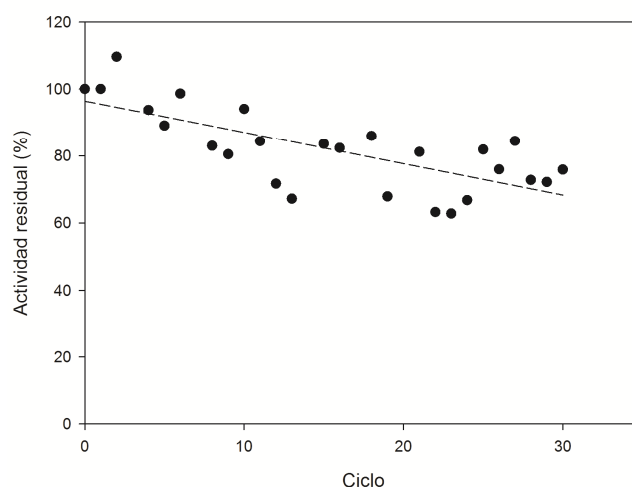
En vista de los resultados obtenidos en los tres últimos apartados, se decidió que el mejor biocatalizador para la síntesis de nucleósidos no naturales basado en la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus* es *BpNDT* inmovilizada sobre agarosa PEI 600 Da entrecruzada con dextrano 20 kDa, 70 % oxidación (inmovilizada en presencia de glicerol 20 %). Para aumentar la actividad del derivado se elevó la carga a 2 mg de enzima por g de soporte, consiguiendo una actividad específica de 18 UI/g de agarosa y una actividad relativa de 56 % respecto a la actividad inicial de la enzima soluble. Este último derivado inmovilizado, a partir de ahora denominado *DABpNDT10*, fue el empleado para los experimentos que se describen a continuación.

#### 7.4. Reutilización del biocatalizador inmovilizado

Al contrario que las enzimas libres, las enzimas inmovilizadas ofrecen ventajas técnicas y económicas a nivel industrial ya que, al poder ser reutilizadas, permiten la realización de varios ciclos catalíticos sin renovar la enzima.

Se evaluó la actividad del derivado *DABpNDT10* en ciclos catalíticos consecutivos (apartado 19.5 de Materiales y Métodos). *BpNDT* inmovilizada puede ser reutilizada al menos 30 ciclos

consecutivos en la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina y adenina a 37 °C y pH 8,0 con pérdida del 20 % de actividad (Figura 64).

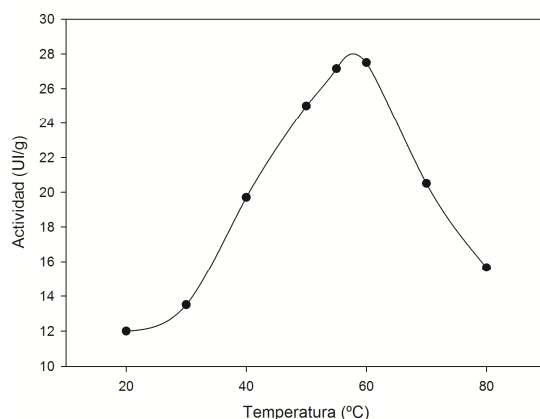


**Figura 64.** Ciclos de utilización de *BpNDT* inmovilizada. Condiciones de reacción: 200 mg de biocatalizador se incubaron con 8 mL de dUrd, Ade 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8 durante 5 min, 37 °C, 250 r.p.m.

### 7.5. Efecto de la temperatura sobre el derivado inmovilizado

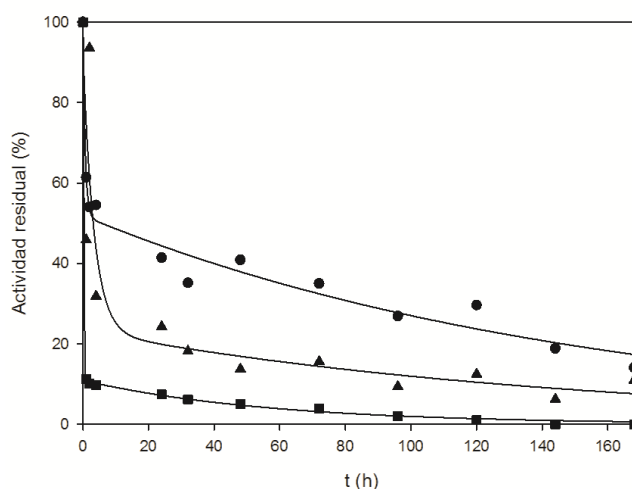
Para determinar la temperatura óptima del biocatalizador de *BpNDT* inmovilizada DABpNDT10 se llevó a cabo la reacción estándar entre 4 y 80 °C (apartado 19.6 de Materiales y Métodos). Como se puede observar en la figura 65, la actividad enzimática aumenta con la temperatura hasta los 60 °C, para a continuación disminuir rápidamente debido a la desnaturalización de la enzima. El máximo de actividad se encuentra desplazado 10 °C respecto a la temperatura óptima de transglicosilación de la enzima libre (Figura 45 A), 50 °C, hecho que podría ser debido a una mayor rigidez de la enzima al estar unida al soporte.

Por otra parte, se calculó la energía de activación de DABpNDT10 aplicando la ecuación de Arrhenius, ecuación [3] (apartado 12 de Materiales y Métodos), 23,2 kJ/mol.



**Figura 65.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de *Bp*NDT inmovilizada. Condiciones de reacción: 15 mg de biocatalizador se incubaron con 500  $\mu$ L de dUrd y Ade 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8.0 durante 5 min a distintas temperaturas.

Por otro lado se estudió la inactivación térmica del derivado a 40 °C, 50 °C y 60 °C (apartado 19.6 de Materiales y Métodos) para ver el efecto de la inmovilización sobre la estabilidad de *Bp*NDT a varias temperaturas.



**Figura 66.** Inactivación térmica de *Bp*NDT inmovilizada a 40 °C (●), 50 °C (▲) y 60 °C (■). A los distintos tiempos el derivado se filtró, pesó y se cuantificó su actividad en la síntesis de dAdo.

A diferencia del comportamiento de *Bp*NDT libre, que mantiene su actividad a 40 °C y 50 °C durante al menos 96 h (Figura 50), y se desactiva a 60 °C y 70 °C mediante decaimiento exponencial simple, *Bp*NDT inmovilizada se inactiva a todas las temperaturas ensayadas (Figura 66).

Se aplicó la ecuación [8] (apartado 19.6 de Materiales y Métodos) para calcular los parámetros de termoinactivación (Tabla 20). A 40 °C la actividad disminuye en una primera etapa hasta el 52,7 % y se desactiva lentamente ( $k_2$  es menor que  $k_1$ ) en un segundo paso. La desactivación a 50 °C se produce más rápidamente en la primera etapa, disminuyendo la actividad hasta el 32 %. Al igual que en el caso anterior,  $k_2$  es menor que  $k_1$ , y se alcanza la desactivación total de la enzima al final del proceso. A 60 °C la enzima inmovilizada pierde el 90 % de su actividad después de 1 h de incubación, mientras que la enzima libre tiene una vida media de 21,8 h.

**Tabla 20.** Desactivación enzimática a 40, 50 y 60 °C de *Bp*NDT inmovilizada.

T (°C)	A <sub>1</sub>	k <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	A <sub>2</sub>	k <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	α <sub>1</sub> (%)	α <sub>2</sub> (%)	t <sub>1/2</sub> (h)
40	48.1	1.54	51.9	6.7·10 <sup>-3</sup>	52.7	0	5.3
50	69.6	0.30	23.2	6.7·10 <sup>-3</sup>	32.2	0	3.2
60	89.1	6.0·10 <sup>6</sup>	10.9	0.02	10.7	0	0.3

## 7.6. Síntesis de nucleósidos no naturales

El derivado inmovilizado escogido, *DABp*NDT10, se empleó para sintetizar varios nucleósidos no naturales de interés terapéutico, 5-trifluorotimidina (5-TFThd), agente antiviral contra el virus del herpes simple (Suzuki et al, 2011), 5-aza-2'-desoxicitidina (5-azadCyd), inhibidor de la metilización del DNA de diversos tumores, y 5-aza-2'-desoxiuridina (5-azadUrd), que complementa la acción del nucleósido anterior (Christman, 2002).

La reacción de síntesis de estos compuestos se llevó a cabo como se describe en el apartado 19.7 de Materiales y Métodos, empleando sustratos 10 mM para la síntesis de 5-azadCyd y 5-azadUrd, y distintas concentraciones de nucleósido y base de partida (1-30 mM) en la síntesis de 5-TFThd.

En cuanto a la síntesis de 5-trifluorotimidina, se analizó la variación de actividad dependiendo de la proporción de sustratos empleada, ya que las reacciones de transglicosilación son reversibles (Britos et al, 2012). Como se observa en la tabla 21, la mejor conversión (64,4 %) se alcanzó al emplear 20 mM de dUrd y 10 mM de 5-tFThy, aunque la productividad fue mayor al utilizar 20 mM de ambos sustratos (5,56 mM/h). La síntesis de este análogo de nucleósido a partir de 20 mM de dUrd y 10 mM de 5-tFThy mediante la *BsPy*NP o la *Ec*TP inmovilizadas conllevó al 57 % de conversión en 10 h y al 51 % en 3 h respectivamente (Serra et al, 2013a).

**Tabla 21.** Síntesis de 5-trifluorotimidina a diferentes concentraciones de sustratos.

dUrd (mM)	5-tFThy (mM)	Conversión (%)	5-tFThd (mM)	Productividad (mM/h)
2	2	49,2	0,98	0,49
20	10	64,4	6,44	3,22
10	10	58,3	5,83	2,92
20	20	55,6	11,12	5,56
30	30	53,4	16,02	2,67

Condiciones de reacción: 95 mg de derivado se incubaron con 5 mL de dUrd y 5-TFThy a distintas concentraciones en tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,5 a 37 °C durante 2 h.

Por otra parte, al emplear una concentración 1 mM de ambos sustratos, *Bp*NDT inmovilizada presentó 11,3 UI/g de actividad específica en la síntesis de 5-trifluorotimidina a 37 °C y pH 7,5, 7,5 veces más que la actividad mostrada por *Lr*NDT inmovilizada covalentemente sobre Sepabeads y 140 más que la mostrada por la misma enzima inmovilizada en perlas magnéticas de quitosano (Fernández-Lucas et al, 2011; Fernández-Lucas et al, 2013).

Respecto a la síntesis de 5-aza-2'-desoxicitidina (5-azadCyd), se alcanzó un 76 % de conversión después de 3 h a partir de 5-azaCyt y dUrd 10 mM (productividad de 2,54 mM/h). Por el contrario, no se detectó actividad en la síntesis de 5-azadUrd. Hasta el momento sólo se había sintetizado enzimáticamente la 5-azadCyd empleando una NDT, la *Lr*NDT inmovilizada en Sepabeads, ya que las timidina fosforilasas no aceptan derivados aza de uracilo y timina (Serra et al, 2011). *Lr*NDT inmovilizada en Sepabeads llevó a cabo la síntesis de 5-azadCyd a partir de 1 mM de 5-azaUra y dUrd con una actividad específica de 1,75 UI/g (Fernández-Lucas et al, 2011).

## **V. DISCUSIÓN**



Los nucleósidos no naturales de interés terapéutico, moléculas con actividad antitumoral y antiviral, se han sintetizado tradicionalmente de forma química, necesitando pasos de protección y desprotección del grupo (2'-desoxi) ribosa o de la base que aumentan el tiempo de producción y el precio del producto final (Boryski et al, 2008). Los métodos químicos llevan a cabo la condensación del carbohidrato precursor y de la base heterocíclica o emplean nucleósidos naturales como compuestos de partida. En la glicosilación química es importante el control de la configuración del centro anomérico y de la formación del enlace glicosídico regioselectivo. La regio-, quimio- y estereoselectividad de la reacción de glicosilación depende del uso de azúcares y bases correctamente activados y protegidos que son preparados previamente mediante varias etapas (Terreni et al, 2008).

Por el contrario, la síntesis enzimática de estos análogos de nucleósidos presenta la ventaja de emplear condiciones de reacción suaves, ser respetuosa con el medio ambiente y ser estereo y regioselectiva (Fresco-Taboada et al, 2013a; Li et al, 2010; Mikhailopulo, 2007). La síntesis enzimática es un proceso que forma parte de la biotecnología blanca, también conocida como biotecnología industrial, definida como el proceso de utilizar enzimas y microorganismos para producir compuestos de interés en un amplio abanico de sectores: químico, farmacéutico, alimentación, detergentes, papel, textil, energía, materiales y polímeros. La biotecnología blanca sustituye los procesos químicos por los biológicos y por tanto disminuye el impacto ambiental al reducir la emisión de dióxido de carbono, el consumo de energía y el uso de agua (Frazzetto, 2003; Lorenz et al, 2005).

Las biotransformaciones se pueden llevar a cabo empleando el biocatalizador en una de las siguientes formas: células enteras, extractos libres de células, enzimas purificadas o enzimas inmovilizadas. El uso de microorganismos enteros conlleva problemas a la hora de purificar el producto final, debido a las reacciones secundarias catalizadas por otras enzimas así como por los problemas difusionales intra- y extracelulares. Una alternativa eficaz es el uso de enzimas purificadas, ya que se reducen considerablemente los inconvenientes anteriormente mencionados, aunque su aplicación industrial se ve limitada por la inestabilidad de la proteína en condiciones no fisiológicas, la dificultad de recuperar el biocatalizador del medio de reacción y los altos costes de producción. Las enzimas inmovilizadas no presentan estos inconvenientes, ya que permiten la reutilización del biocatalizador y el aumento de la estabilidad de las enzimas (Terreni et al, 2008).

Dentro de la biotecnología blanca existen varias áreas de investigación, una de ellas es la identificación de nuevas enzimas y microorganismos que proporcionen nuevos productos o



mejoren los procesos de síntesis ya existentes. Respecto a los nucleósidos de interés terapéutico, son numerosos los esfuerzos que existen hoy en día por encontrar enzimas capaces de sintetizar estos compuestos en condiciones respetuosas con el medio ambiente y en condiciones sostenibles. De las enzimas que pueden utilizarse industrialmente para la síntesis de nucleósidos terapéuticos, las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas presentan ventajas frente a las fosforilasas, como la síntesis en un solo paso empleando una enzima única o la inmovilización de una sola enzima. En 2007, Fernández-Lucas y colaboradores llevaron a cabo un estudio para encontrar nuevos microorganismos que presentasen actividad DRT para su utilización como alternativa a la síntesis química en la síntesis de nucleósidos de interés terapéutico. Para ello realizaron el cribado de 147 cepas bacterianas en función de su capacidad para sintetizar 2'-desoxiadenosina (dAdo) a partir de 2'-desoxiuridina (dUrd) y adenina (Ade) a dos temperaturas, 57 y 70 °C (Fernández-Lucas et al, 2007). Entre los microorganismos positivos se encontraba una especie psicrotolerante, *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074, capaz de llevar a cabo la reacción únicamente a la temperatura más baja, a diferencia de un *Bacillus* mesófilo presente en el estudio, *B. coagulans*, que presentó actividad a ambas temperaturas. Este resultado se relacionó con las características psicrotolerantes de dicha bacteria, que podría tener enzimas sensibles a las altas temperaturas.

A diferencia de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas de microorganismos mesófilos y termófilos, tan solo se ha descrito hasta el momento una NDT de un microorganismo psicrófilo, *Desulfotalea psychrophila* (Alfaro-Ureña, 2012). Este microorganismo presenta gran interés como fuente de enzimas por presentar estas mayores eficacias catalíticas a bajas temperaturas que sus homólogos mesófilos y termófilos.

Por otra parte, el empleo biotecnológico de enzimas requiere el conocimiento en profundidad de las condiciones óptimas de trabajo, de su estructura y de los aminoácidos implicados en la catálisis. Por este motivo se abordó la obtención, caracterización e inmovilización de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074. Por ello se han llevado a cabo la clonación y expresión del gen que codifica la NDT de este microorganismo seguido de la purificación de la enzima, su caracterización bioquímica y estructural y su cristalización. Para permitir la utilización a nivel industrial de este biocatalizador, se llevó a cabo la inmovilización iónica de BpNDT en glioxil agarosa, seguida de entrecruzamiento con dextrano aldehídico.

## 1. *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074, un microorganismo psicrotolerante con actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa tipo II

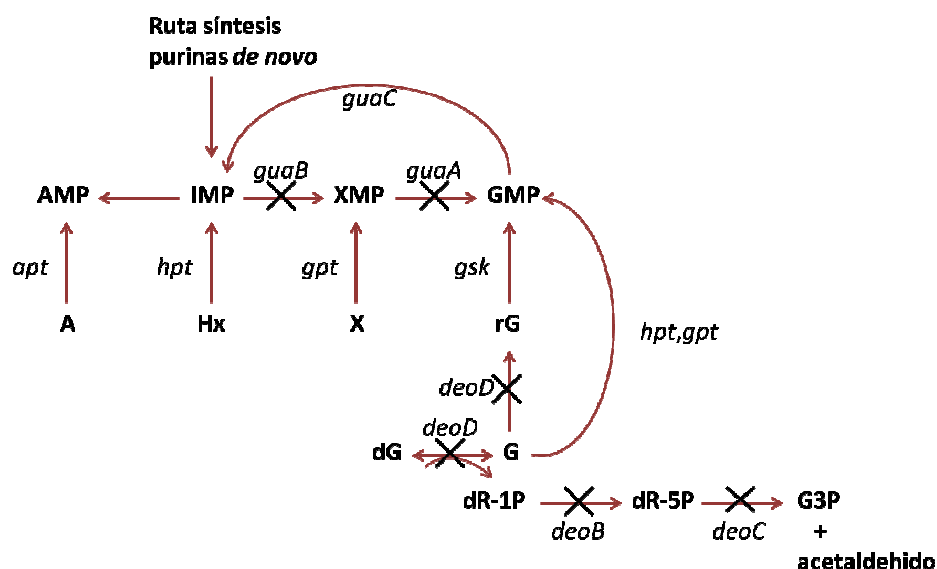
*Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 presenta una temperatura óptima de crecimiento de 28 °C, por lo que debe considerarse un microorganismo psicrotolerante.

Este psicrotolerante recuerda a *Bacillus circulans* entre las especies mesófilas de *Bacillus*. Sin embargo, mientras que la temperatura mínima de crecimiento para *B. psychrosaccharolyticus* es 0 °C, para *B. circulans* es 10-15 °C. Además, las células del primero son más grandes y granuladas que las del segundo (Larkin et al, 1967).

La existencia de actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa en *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 se comprobó al realizar la síntesis de dAdo a partir de dUrd y Ade utilizando las células del microorganismo como biocatalizador, y, tras purificar la enzima a homogeneidad a partir del microorganismo productor se determinó que esta era una DRT de tipo II. Los bajos rendimientos en la purificación a partir de *B. psychrosaccharolyticus* conllevaron a abordar la identificación, clonación y expresión del gen *ndt* que codifica la DRT tipo II con el fin de llevar a cabo su caracterización e inmovilización para su empleo como biocatalizador en la síntesis de nucleósidos de interés terapéutico.

En una primera etapa, la identificación de la secuencia del gen *ndt* se realizó mediante la construcción de una genoteca de *B. psychrosaccharolyticus* en *E. coli* PAK6 mediante el plásmido pSU19N y el posterior cribado en función de su capacidad para hidrolizar dGua. Esta selección genética se puede aplicar a clones que codifiquen una nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa o una desoxirribosil hidrolasa de cualquier organismo (Kaminski, 2002).

La cepa PAK6 de *E. coli* es auxótrofa para guanina ya que presenta delecionados varios genes de la ruta de salvamento de purinas (*guaB*, *guaA* y el operón *deoCABD*), de modo que el metabolito GMP sólo puede formarse a partir de guanina a través de la guanina fosforribosiltransferasa, al estar delecionadas la purina nucleósido fosforilasa y la timidina fosforilasa (Figura 67) (Kaminski, 2002). Aún así, se puede producir crecimiento residual debido a que esta cepa también codifica la xantosina fosforilasa, que, aunque no actúa sobre adenina o nucleósidos de adenina, sí puede hidrolizar xantosina, guanosina e inosina (Dandanell et al, 2005).



**Figura 67.** Representación esquemática de los genes deletados en la ruta de salvamento de purinas en *E. coli* PAK6. Las enzimas de la ruta se representan por los nombres de los genes que las codifican: *guaB*, IMP deshidrogenasa; *guaA*, GMP sintetasa; *guaC*, GMP reductasa; *apt*, adenosina fosforribosiltransferasa; *gpt*, guanosina fosforribosiltransferasa; *hpt*, hipoxantina fosforribosiltransferasa; *gsk*, guanosina quinasa; *deoD*, purina nucleósido fosforilasa; *deoB*, fosfopentomutasa; *deoC*, desoxirriboaldolasa; X, xantina; G, guanina; rG, guanosina; dG, desoxiguanosina; DR-1P, desoxirribosa-1-fosfato; DR-5P, desoxirribosa-5-fosfato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato (Kaminski, 2002).

Como se puede observar en la figura 29 de Resultados, se aisló un clon que, a diferencia del control, podía crecer en medio mínimo M9 con dGua y Ade 0,3 mM. El fragmento de DNA, de 1,5 Kb, contiene un marco de lectura que pertenece a la familia de las glicosiltransferasas de tipo 1 (GT1, EC 2.4.1.-), dentro de la superfamilia GT-B, según el análisis del servidor Blast.

Las glicosiltransferasas (GTs; EC 2.4.x.y) constituyen una familia de enzimas implicadas en la biosíntesis de oligosacáridos, polisacáridos y glicoconjugados; siendo muy abundantes las que transfieren un residuo de azúcar de un donador activado a moléculas aceptoras, formando enlaces glicosídicos. La transferencia del residuo glicosil ocurre con retención o inversión de la configuración del carbono anomérico (Breton et al, 2006; Chang et al, 2011). Estructuralmente se diferencian tres tipos de glicosiltransferasas, GT-A, GT-B y GT-C, ya que la mayoría de estas enzimas han evolucionado a partir de un pequeño número de secuencias progenitoras. El plegamiento GT-A consiste en un sándwich  $\alpha/\beta/\alpha$  que recuerda al plegamiento Rossmann. La lámina  $\beta$  central se encuentra flanqueada por una más pequeña, y la asociación de ambas forma el centro activo. Por el contrario, la arquitectura de las enzimas GT-B consiste en dos dominios  $\beta/\alpha/\beta$  similares a Rossmann ligados por una región conectora y con el centro activo

localizado entre ambos dominios. Por último, las glicosiltransferasas GT-C son proteínas de membrana altamente hidrofóbicas formadas por 8-13 hélices transmembrana (Breton et al, 2006; Lairson et al, 2008).

Cabe destacar que existen enzimas con plegamiento GT-A y GT-B que no son glicosiltransferasas, y que la predicción de la función de una posible glicosiltransferasa por homología de secuencia puede ser problemática, ya que hay secuencias muy cercanas que tienen diferente actividad catalítica.

La secuencia obtenida mediante el cribado funcional de la genoteca de *B. psychrosaccharolyticus* obtenido en *E. coli* PAK6 se clonó e intentó expresar en *E. coli* BL21 (DE3) y *B. subtilis* BG214 sin éxito, hecho que se puede explicar de dos formas, que tenga realmente función glicosiltransferasa de tipo I o que tenga una secuencia similar a las enzimas con plegamiento GT-B pero una función distinta. Las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas son glicosiltransferasas de tipo II, por lo que si la asignación de glicosiltransferasa de tipo I es correcta, la secuencia no corresponde al gen *ndt* y la formación de guanina podría haberse producido mediante la xantosina fosforilasa. La otra posibilidad es que la secuencia sea una desoxirribosil hidrolasa con homología de secuencia con las glicosiltransferasas, de modo que no haya podido llevar a cabo la transferencia del grupo desoxirribósido entre dGua y Ade, pero sí la hidrólisis de dGua a Gua, permitiendo el crecimiento de PAK6 (Figura 67).

Debido a la imposibilidad de obtener el gen *ndt* y su producto proteico, la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus*, mediante cribado funcional de la genoteca de *B. psychrosaccharolyticus* en *E. coli* PAK6, se procedió a abordar su aislamiento y clonación mediante otra estrategia, la secuenciación del genoma de *B. psychrosaccharolyticus*, lo que además ha permitido el análisis del mismo. Una vez secuenciado pudimos conocer más información sobre la secuencia obtenida a partir de la genoteca en *E. coli* PAK6. La secuencia de aminoácidos codificada por el hipotético gen *ndt* aislado y clonado, se localizó con el programa BioEdit en el genoma de *Bacillus psychrosaccharolyticus*, en el contig 110. A través del servidor RAST se observó que no existe ningún otro marco de lectura en ese mismo contig, y que la secuencia está clasificada como glicosiltransferasa de tipo 1 (EC 2.4.1), es decir, es glicosiltransferasa, como las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas, pero no transfiere residuos de pentosa sino de hexosa, es hexosiltransferasa.

En los últimos años se han secuenciado varios *Bacilli*, algunos mesófilos como *B. pumilus* (Su et al, 2011), *B. megaterium* (Eppinger et al, 2011; Liu et al, 2011) o *B. amyloliquefaciens* XH7 (Yang et al, 2011), y otros termófilos como *B. cereus* Q1 (Xiong et al, 2009). A pesar de que se

han secuenciado diversas bacterias psicrófilas (Pandiya et al, 2013; Yin et al, 2013), ninguna de ellas pertenece al género *Bacillus*, y solo *D. psychrophila* presenta actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa (Alfaro-Ureña, 2012).

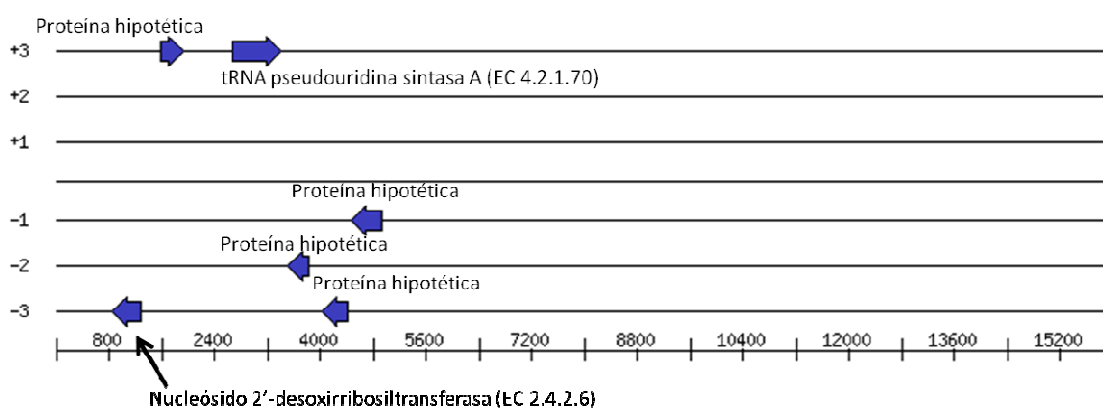
El género *Bacillus* es un género diverso, con especies que difieren radicalmente en su localización en la naturaleza y en sus propiedades metabólicas. Además, tienen contenido GC variado, situado entre el 34 % de *B. cereus* y el 44 % de *B. subtilis* (Eppinger et al, 2011). En el caso de *Bacillus psychrosaccharolyticus*, su genoma presenta 39 % de contenido GC, y de los 4741 ORFs detectados, el 30 % corresponden a proteínas hipotéticas.

Los organismos psicrófilos y psicrotolerantes presentan mayor habilidad para llevar a cabo la transcripción a temperaturas bajas, por lo que las proteínas implicadas en este proceso pueden ser cruciales para estos organismos (Rabus et al, 2004). *B. psychrosaccharolyticus* presenta los genes codificantes de 5 tipos distintos de factores de elongación de la transcripción (G, Tu, Ts, LepA, y P), que podrían contribuir a este proceso. Además, a bajas temperaturas es importante el control del plegamiento y de la degradación del RNA, característica que se manifiesta por la presencia de 6 helicasas de RNA dependientes de ATP, de las cuales 5 pertenecen a la familia de helicasas de RNA con caja DEAD. El mismo número de estas enzimas se encuentran también en el microorganismo psicrófilo *Flavobacterium psychrophilum*, mientras que en la archaia antártica *Methanococcoides burtonii*, las helicasas se encuentran sobreexpresadas a baja temperatura y están implicadas en la desestabilización de la estructura secundaria de los ácidos nucleicos (Duchaud et al, 2007). De este modo, las helicasas permiten a las bacterias sobrevivir ante un choque frío y crecer a baja temperatura (Lim et al, 2000).

Todas las enzimas sobreexpresadas a temperaturas bajas que fueron identificadas al llevar a cabo el estudio proteómico de *Bacillus psychrosaccharolyticus* a 0 y 15 °C (Seo et al, 2004) fueron detectadas en el genoma. Al disminuir la temperatura se observa un aumento en la expresión de diversas proteínas, siendo las más abundantes las proteínas glicolíticas (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fructosa bifosfato aldolasa), seguidas de las relacionadas con la transcripción (proteínas ribosomales 50S L7/L10/L12 o 30S S6) y las proteínas generales de respuesta a estrés, a pesar de que el ambiente frío debería constituir su condición óptima de crecimiento. Por el contrario, no se detectó aumento de expresión del factor de transcripción SigB, responsable de la respuesta a frío, aunque sí el de una chaperonina para mermar las dificultades de plegamiento proteico y estabilidad producidas a bajas temperaturas.

En general, los organismos se aclimatan al ambiente en el que viven modificando la actividad catalítica de sus enzimas. Por ejemplo, las enzimas de organismos termófilos deben ser estables a altas temperaturas. Por el contrario, las enzimas de los organismos psicrófilos no son más estables porque las bajas temperaturas no dañan la estabilidad, sino que microorganismos como *B. psychrosaccharolyticus* incrementan la expresión de sus enzimas para compensar la baja actividad.

Respecto al gen hipotético *ndt* que codifica la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus* (*BpNDT*) (Figura 37), se localizó mediante el servidor RAST en el contig 167 del genoma. Como se puede observar en la figura 68, existen 6 marcos de lectura abiertos posibles en este contig, situándose la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa en el marco de lectura -3.



**Figura 68.** Contig 167 del genoma de *Bacillus psychrosaccharolyticus*. Representación de los 6 marcos de lectura posibles y de las hipotéticas proteínas.

La secuencia de la hipotética *BpNDT* presenta los residuos conservados implicados en la catálisis de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas. Los estudios de expresión del gen *ndt* en *E. coli* BL21 (DE3) muestran la producción de la proteína *BpNDT* en el citoplasma en forma soluble (Figura 40). En general, las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas se sitúan en el citoplasma, pero se ha demostrado que la NDT de *Lactobacillus fermentum* (*LfNDT*) también se localiza en la superficie celular. *LfNDT* no tiene ningún sistema de anclaje a la membrana y puede ser liberada de la misma al cambiar de pH, por lo que se cree que pueda estar unida a través de interacciones no covalentes (Lin et al, 2011).

Una vez clonado y expresado el gen *Bpndt* en *E. coli* BL21 (DE3), la purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus*, *BpNDT*, se llevó a cabo mediante tres pasos cromatográficos: i) cromatografía de intercambio aniónico, ii) de exclusión molecular e

iii) isoenfoque. El seguimiento de la enzima en los distintos pasos de purificación se realizó mediante PAGE-SDS, ya que debido a la presencia de purina nucleósido fosforilasa y timidina fosforilasa en las células de *E. coli*, no se pudo determinar mediante ensayo de actividad (Luo et al, 2011; Timofeev et al, 2013).

La purificación de *Bp*NDT conllevó a la obtención de 9,2 mg de proteína/L de caldo de cultivo con una actividad 392 UI/L de caldo de cultivo en la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina y adenina, mientras que la purificación de la DRT de tipo II de *Desulfotalea psychrophila* produjo un rendimiento mucho menor, 1 UI/L de caldo de cultivo (Alfaro-Ureña, 2012).

La clasificación de *Bp*NDT como nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de tipo II permite su aplicación como biocatalizador en un mayor número de procesos, ya que puede reconocer tanto bases púricas como pirimidínicas (Holguin et al, 1975b).

Además, en el genoma se localizaron genes hipotéticos codificantes de pirimidina y purina nucleósido fosforilasas, pero, como se muestra en la tabla 7, experimentalmente se demostró que *B. psychrosaccharolyticus* no posee esa actividad, ya que no reconoce ribonucleósidos como sustrato de partida en una reacción de transglicosilación.

## **2. *Bp*NDT, una enzima psicrotolerante de la familia de las glicosiltransferasas de tipo II**

Las glicosiltransferasas pueden clasificarse según el grupo azúcar que transfieran, además de según su estructura (GT-A, GT-B, GT-C). Así, se distinguen dos tipos principales, tipo I: que lleva a cabo la transferencia de residuos de hexosa, y tipo II: que cataliza la transglicosilación en la que están implicados residuos de pentosa. Existe un tercer tipo, menos abundante, en el que se engloban todas aquellas glicosiltransferasas que catalizan la transferencia de otros residuos de azúcar distintos de hexosa o pentosa.

Así, la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 debe ser clasificada como glicosiltransferasa de tipo II, ya que lleva a cabo la transglicosilación sobre residuos de pentosa.

Para conocer las características de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus* se procedió al estudio de las condiciones óptimas de actividad, determinación de la estabilidad y elucidación estructural.

El efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la enzima muestra que la actividad máxima se alcanza a 50 °C aunque comienza a disminuir su estabilidad a partir de 40 °C. Estos resultados confirman que *B. psychrosaccharolyticus* es un microorganismo psicrotolerante, ya que, aunque es capaz de llevar a cabo la reacción a 4 °C (Figura 45), su actividad máxima es similar a la de *LrNDT* (NDT de *Lactobacillus reuteri*) y es más estable que *LcNDT* (NDT de *Lactococcus lactis*), ambos microorganismos mesófilos (Fernández-Lucas et al, 2010; Miyamoto et al, 2007). Este comportamiento también se observó en enzimas de otros microorganismos psicrófilos, como la NDT de *Desulfotalea psychrophila* (*DpNDT*) (Alfaro-Ureña, 2012) o las deshidrogenasas dependientes de NAD(P)<sup>+</sup> de *Flavobacterium frigidimaris*, donde cuatro de ellas son psicrófilas y termolábiles, mientras que otras tres son inesperadamente termófilas y termoestables (Duchaud et al, 2007).

Estos resultados también están en concordancia con los estudios de inactivación térmica, ya que *BpNDT* es estable a 40 y 50 °C durante al menos 96 h. Al comparar los resultados de inactivación térmica con los descritos para *DpNDT* se observó que la estabilidad de *BpNDT* es mayor, ya que la primera comienza a perder actividad después de 20 h a 40 °C y de 10 h a 50 °C (Alfaro-Ureña, 2012). Además, *BpNDT* mantiene su actividad durante un periodo de tiempo mayor que una 2'-desoxirribosiltransferasa mesófila, *LrNDT*, ya que esta última se comporta igual que *DpNDT* a 40 °C (Fernández-Lucas et al, 2010). En los tres casos la desactivación a 60 °C se produce a través de un decaimiento exponencial simple (ecuación [4]), siendo el tiempo de vida media de *BpNDT* (21,8 h) mayor al de *DpNDT* (10,8 h) y mucho mayor al de *LrNDT* (17,9 min); aunque al considerar la temperatura de crecimiento de los microorganismos cabría esperar el comportamiento contrario.

Por otro lado, la temperatura de desnaturalización de *BpNDT* es 49 °C, dato que concuerda con la estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas, en la que la estabilidad comienza a disminuir cuando se alcanzan los 50 °C, aunque contradictoriamente la actividad máxima se alcanza a esa temperatura (Figura 45). La *T<sub>m</sub>* de *BpNDT* es 10 °C menor que la *T<sub>m</sub>* de las NDTs descritas en la bibliografía, *LrNDT* (64 °C) y *DpNDT* (59 °C), procedentes de organismo mesófilo y psicrófilo respectivamente (Fernández-Lucas et al, 2010; Alfaro-Ureña, 2012). Feller describió que la mayoría de las enzimas psicrófilas presentan actividad lábil a altas temperaturas, siendo el centro activo el elemento más sensible de la estructura (Feller, 2013). Como consecuencia,



la  $T_m$  de las enzimas adaptadas al frío es al menos 10 °C mayor que la temperatura óptima para la actividad, mientras que en organismos mesófilos y termófilos la diferencia entre ambos valores es casi nula. Por tanto, en este caso el comportamiento de *Bp*NDT se asemeja más al de una enzima mesófila que psicrófila. Se ha visto que las lactato deshidrogenasas psicrófilas tienen mayor identidad de secuencia con sus homólogas termófilas que con las mesófilas, por lo que las psicrófilas podrían tener adaptaciones estructurales para operar a bajas temperaturas similares a las que tienen las termófilas para altas temperaturas (Okubo et al, 1999). Para comprobar si las 2'-desoxirribosiltransferasas se comportan del mismo modo, habría que estudiar una NDT termófila para determinar si la desactivación térmica de *Bp*NDT y *Dp*NDT es más parecida a la de las NDTs termófilas que a la de las mesófilas.

Otro factor importante en la actividad enzimática es el pH. El pH óptimo de *Bp*NDT se sitúa entre 7,5 y 8,0 (Figura 46), al contrario que en *Dp*NDT y *Lr*NDT, que presentan actividad en un amplio intervalo de pH, 6-10 y 5-7 respectivamente (Alfaro-Ureña, 2012; Fernández-Lucas et al, 2010). El intervalo de estabilidad de *Bp*NDT con el pH es mayor, entre 6 y 9, pero no permite la síntesis de nucleósidos a partir de bases poco solubles en tampones acuosos que necesitan valores de pH elevados para su disolución (9-12), como las bases púricas guanina y xantina (Alfaro-Ureña, 2012; Okuyama et al, 2003).

Respecto a la presencia de cationes en el ensayo de actividad, la actividad de *Bp*NDT no aumenta con la adición de cationes monovalentes, a diferencia de *Lc*NDT, que incrementa su actividad un 60 % en presencia de 1 mM de  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{K}^+$ . Por el contrario, la presencia de cationes divalentes como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , presenta efecto inhibitorio sobre *Bp*NDT a las dos concentraciones ensayadas (1-5 mM), al igual que sobre *Lr*NDT y *Lc*NDT (Fernández-Lucas et al, 2010; Miyamoto et al, 2007).

Por otra parte, el estudio de la especificidad de sustrato con nucleósidos y bases naturales indicó que *Bp*NDT, aunque acepta distintas bases naturales, muestra preferencia por las purinas como aceptores ( $\text{Hyp} > \text{Ade} > \text{Cyt} > \text{Thy} \approx \text{Ura}$ ) y por los nucleósidos pirimidínicos como donadores ( $\text{dCyd} > \text{dUrd} \approx \text{Thd} \approx \text{dAdo} > \text{dGua} > \text{dIno}$ ). La especificidad de sustrato de *Bp*NDT en lo que respecta a los nucleósidos donadores es similar a la de otras NDTs (Fernández-Lucas et al, 2010; Kaminski, 2002; Kaminski et al, 2008b), mientras que la especificidad por las bases aceptoras es distinta a la de las NDTs descritas, en las que es similar entre purinas y pirimidinas. La gran afinidad por Hyp como aceptor es comparable únicamente con la NDT de *Lactococcus lactis* (Miyamoto, 2007), mientras que tanto la NDT de *L. fermentum* (Kaminski et al, 2008b) como la NDT de *L. helveticus* (Kaminski, 2002) muestran actividad muy baja en

presencia de dicha base. *Lr*NDT y *Lc*NDT presentan preferencia similar por dIno a la que tienen por otros nucleósidos púricos (dAdo), mientras que *Bp*NDT, al igual que *Lh*NDT y *L*/NDT, es poco específica para este donador. Se ha descrito que *Lh*NDT es muy poco específica para dIno debido al papel de *Lh*PDT en la erradicación de desoxiinosina de la batería de nucleósidos de la célula, siendo la actividad de la PDT 20 veces más alta que la de la NDT cuando se emplea desoxiinosina como sustrato (Kaminski, 2002).

Respecto a la síntesis de nucleósidos no naturales, estudios precedentes revelaron la estricta especificidad de las NDTs por el grupo 2'-desoxirribofuranosa y una amplia tolerancia a modificaciones en las bases púricas y pirimidínicas, aceptando derivados azólicos (Fernández-Lucas et al, 2010; Pochet et al, 1995), purinas modificadas (Fernández-Lucas et al, 2010; Kaminski, 2002) o purinas y pirimidinas halogenadas (Alfaro-Ureña, 2012; Fernández-Lucas et al, 2010). *Bp*NDT puede sintetizar diferentes nucleósidos modificados a partir de un nucleósido natural y una base no natural. Al igual que sucedía con los nucleósidos naturales, las bases púricas, de mayor tamaño, son mejores aceptores y conducen a valores de actividad mayores, ya que se disponen de modo más adecuado en la zona de reconocimiento de la base. Por el contrario, el reconocimiento de nucleósidos no naturales no se produce de forma tan eficaz, ya que las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas son altamente específicas para 2'-desoxirribosa, debido a la inactivación de la enzima que se produce al interaccionar el O2' con el Glu catalítico (Fresco-Taboada et al, 2013a). Sin embargo, parece que esta interacción no tiene lugar cuando el átomo en posición 2' es un flúor, ya que la transferencia del azúcar entre 2'-fluoro-2'-desoxiuridina (DFU) y citosina (Cyt) sí se produce a tiempos largos. Existen otras NDTs que reconocen la DFU como sustrato, como *L*/NDT, que es capaz de catalizar la transferencia de la 2'-fluoro-2'-desoxirribosa desde DFU hasta 1,2,4-triazol-3-carboxamida con un rendimiento bajo después de incubar 14 días a 50 °C (Slater et al, 1996); o *Lr*NDT, que cataliza la síntesis de varios análogos de nucleósidos a partir de DFU o arabinosilnucleósidos y diferentes purinas y pirimidinas modificadas, obteniéndose los productos de reacción después de 24 h a 40 °C (Fernández-Lucas et al, 2010).

En lo que concierne a la estructura, *Bp*NDT es una proteína hexamérica de 92 kDa compuesta por subunidades idénticas, al igual que las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas de bacterias lácticas como *Lr*NDT, *Lh*NDT o *L*/NDT (con masas moleculares que oscilan entre los 108 y 113 kDa) (Cook et al, 1990; Fernández-Lucas et al, 2010; Kaminski, 2002). Por el contrario, *Dp*NDT y *Lc*NDT son homotetrámeros (69 y 68.6 kDa respectivamente) (Alfaro-Ureña, 2012; Miyamoto et al, 2007) mientras que las NDTs de *Crithidia luciliae* y *Borrelia burgdorferi* se organizan en forma de dímeros (Bosch et al, 2006; Steenkamp, 1991). Asimismo, la estructura secundaria de

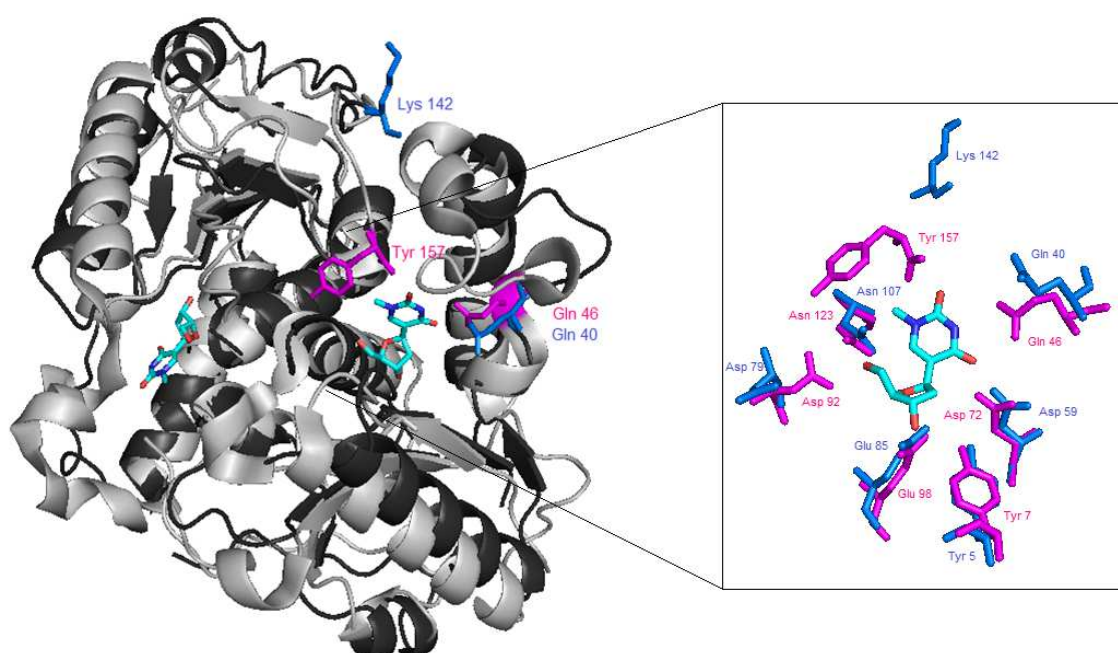
*Bp*NDT se determinó mediante dicroísmo circular y predicciones basadas en la secuencia aminoacídica. Mientras que el contenido de los distintos motivos estructurales es muy similar al de *Dp*NDT (Alfaro-Ureña, 2012), *Bp*NDT presenta 20 % menos de  $\alpha$ -hélice comparado con su homóloga en *L. reuteri* (Fernández-Lucas et al, 2010), siendo una característica típica de enzimas psicrófilas la existencia de menos contenido de estructura secundaria ordenada que en sus homólogas mesófilas (Cavicchioli et al, 2011). Presenta relevancia la ausencia de cisteínas en la secuencia de aminoácidos de *Bp*NDT, por lo que el 2-mercaptoetanol no puede interferir en su actividad, ya que la presencia de un número reducido de puentes disulfuro, o su ausencia, es característica de enzimas adaptadas al frío, incrementándose de este modo la flexibilidad de dichas proteínas (Cavicchioli et al, 2011).

Los primeros estudios cristalográficos sobre las NDTs indicaron que pertenecen a la clase estructural  $\alpha/\beta$  con un centro activo localizado en un bolsillo formado por dos subunidades (Armstrong et al, 1996). La estructura de *Bp*NDT se compone de dos cadenas polipeptídicas que se disponen formando un dímero que a su vez se asocia con otros dos para formar un trímero de dímeros. Este ensamblaje oligomérico se ha observado también en la NDT de *L. leichmannii* (Armstrong et al, 1996) o en la PDT de *L. helveticus* (Anand et al, 2004), esta última empleada como modelo de reemplazo para la determinación de la estructura de *Bp*NDT. Aunque hay un centro activo por subunidad, cada núcleo catalítico completo requiere la participación de aminoácidos de dos subunidades orientadas de forma antiparalela, Tyr<sup>5</sup>, Gln<sup>40</sup>, Asp<sup>59</sup>, Asp<sup>79</sup> y Glu<sup>85</sup> de una de ellas y Asn<sup>107</sup> y Lys<sup>142</sup> de la otra (Figura 60).

En la figura 69 se muestra la superposición de la estructura de *Bp*NDT, en negro, con la estructura de *L*/NDT, en gris, acomplejada con 5-metil-2'-desoxiuridina. Cada monómero de *L*/NDT está formado por 5 láminas  $\beta$  centrales flanqueadas por 4  $\alpha$ -hélices (Armstrong et al, 1996), mientras que *Bp*NDT se dispone de igual modo (5 láminas  $\beta$  centrales paralelas) pero presenta una  $\alpha$ -hélice más. Se puede observar cómo ambas glutaminas están orientadas del mismo modo para unir y estabilizar la base. En el caso de *L*/NDT, la tirosina terminal se encuentra a una distancia adecuada para formar enlace de hidrógeno con la nucleobase, mientras que en *Bp*NDT, aunque el aminoácido terminal, una lisina, se encuentra a mayor distancia, los estudios de mutagénesis han demostrado que la presencia de un aminoácido en esa posición tiene importancia en la actividad de la enzima. Este resultado indica que el carboxilato del residuo terminal no sólo es crítico en las PDTs (Short et al, 1996), aunque sí más importante que en las NDTs, ya que la ausencia de la glutamina fuerza a este residuo a formar dos puentes de hidrógeno con la base. Además, el ángulo de interacción de las purinas con la

2'-desoxirribosiltransferasa es más favorable en las PDT que en las NDT, hecho que compensa la pérdida del residuo de glutamina (Anand et al, 2004).

Asímismo, en *L*/NDT la Gln<sup>46</sup> fuerza a que el giro se cierre sobre el sitio de unión de la base, mientras que en *Bp*NDT se encuentra mucho más abierto, disposición más cercana a la de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas de tipo I, en donde la ausencia de la glutamina conlleva a una conformación más abierta y por ello sólo se quedan retenidas las purinas (Fresco-Taboada et al, 2013a).

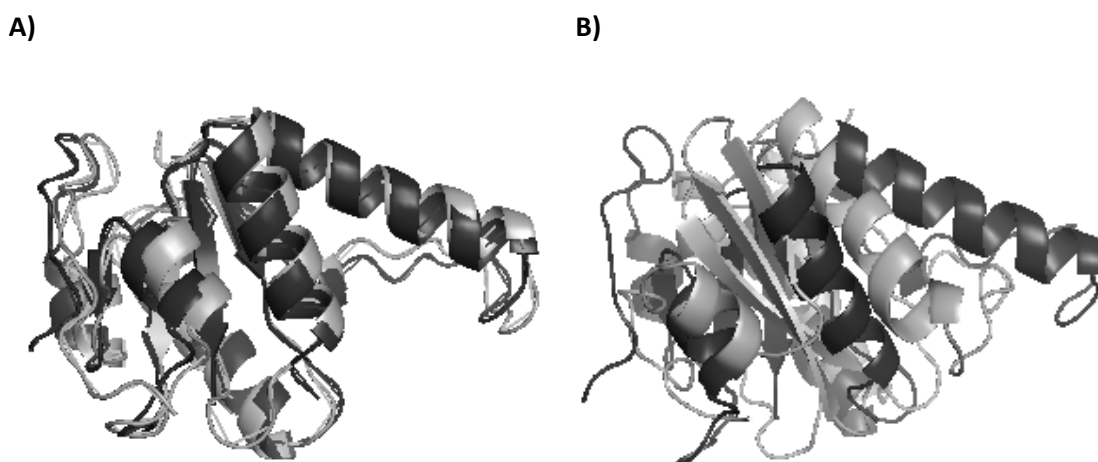


**Figura 69.** Superposición de la estructura de *Bp*NDT (negro) con la estructura de *L*/NDT (PDB 1F8Y, gris). En rosa se muestran los aminoácidos de *L*/NDT y en azul los de *Bp*NDT. El sustrato empleado es 5-metil-2'-desoxiuridina. Figura representada empleando el programa PyMol (DeLano, 2002).

Una vez conocida la estructura real de *Bp*NDT, esta se comparó con los modelos generados mediante servidores de predicción de la estructura terciaria a partir de la secuencia de aminoácidos (Figura 57).

En la figura 70 se puede observar la comparación de la estructura de *Bp*NDT con el modelo que presenta mayor semejanza, el generado mediante HHpred, y el más dispar, el obtenido mediante Quark Ab Initio. En el primero todas las  $\alpha$ -hélices se encuentran en la misma disposición espacial que la estructura real, y solamente difiere una lámina  $\beta$ . En el segundo, por el contrario, ninguno de los elementos de estructura secundaria se encuentra dispuesto de igual modo en modelo y estructura. Esta discrepancia indica que los modelos informáticos

pueden aportar información sobre la estructura terciaria de las proteínas en base a sus homólogos ya cristalizadas, pero es necesario recurrir a técnicas empíricas como la cristalización para conocer la estructura real.



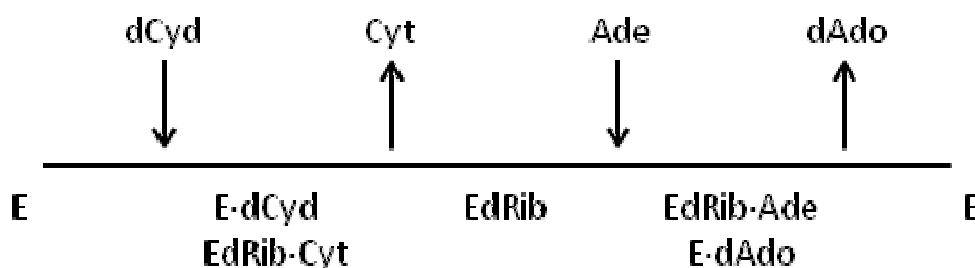
**Figura 70.** Superposición de un monómero del cristal de *BpNDT* (negro) con la estructura obtenida a través del programa A) HHpred y B) Quark Ab Initio (gris). Figura representada empleando el programa PyMol (DeLano, 2002).

### 3. Dilucidación del mecanismo catalítico de *BpNDT*

La catálisis es un proceso que aumenta la velocidad a la que una reacción se acerca al equilibrio. Dado que la velocidad de una reacción es función de la energía libre de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ), una enzima actúa mediante la disminución de la altura de esta barrera cinética, es decir, estabiliza el estado de transición respecto a la reacción no catalizada. Cada enzima lleva a cabo uno de los diversos tipos de mecanismos catalíticos: i) catálisis ácido-base, ii) catálisis covalente, iii) catálisis por iones metálicos, iv) catálisis electrostática, v) efecto por proximidad y orientación, vi) unión preferencial al estado de transición (Mathews et al, 2002). Dentro del mecanismo catalítico se pueden diferenciar dos perspectivas, el mecanismo cinético y el mecanismo químico.

Respecto al mecanismo cinético de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas, los estudios de velocidad inicial de Danzin y colaboradores determinaron que la transferencia del grupo desoxirribósido catalizado por la NDT de *Lactobacillus helveticus* se produce a través de un mecanismo Ping-Pong Bi-Bi (Danzin et al, 1976) (Figura 71), ya que la representación de dobles inversas ( $\frac{1}{v}$  versus  $\frac{1}{[S]}$ ) con concentraciones variables de uno de los sustratos manteniendo el

otro fijo genera líneas paralelas. *Bp*NDT se comporta del mismo modo (Figura 48), aunque si se fija la Ade y se varía la concentración de dCyd se produce un incremento en la pendiente al convertirse la Ade en sustrato inhibitorio a una concentración de 15 mM. En los mecanismos Ping-Pong en los que ambos sustratos se unen al mismo sitio de unión de la enzima, es típica la inhibición competitiva por sustrato, y se observa con mayor frecuencia en la dirección no fisiológica de la reacción (Cook et al, 2007).



**Figura 71.** Representación de Cleland del mecanismo de la reacción 2'-desoxicitidina + adenina  $\rightleftharpoons$  2'-desoxiadenosina + citosina.

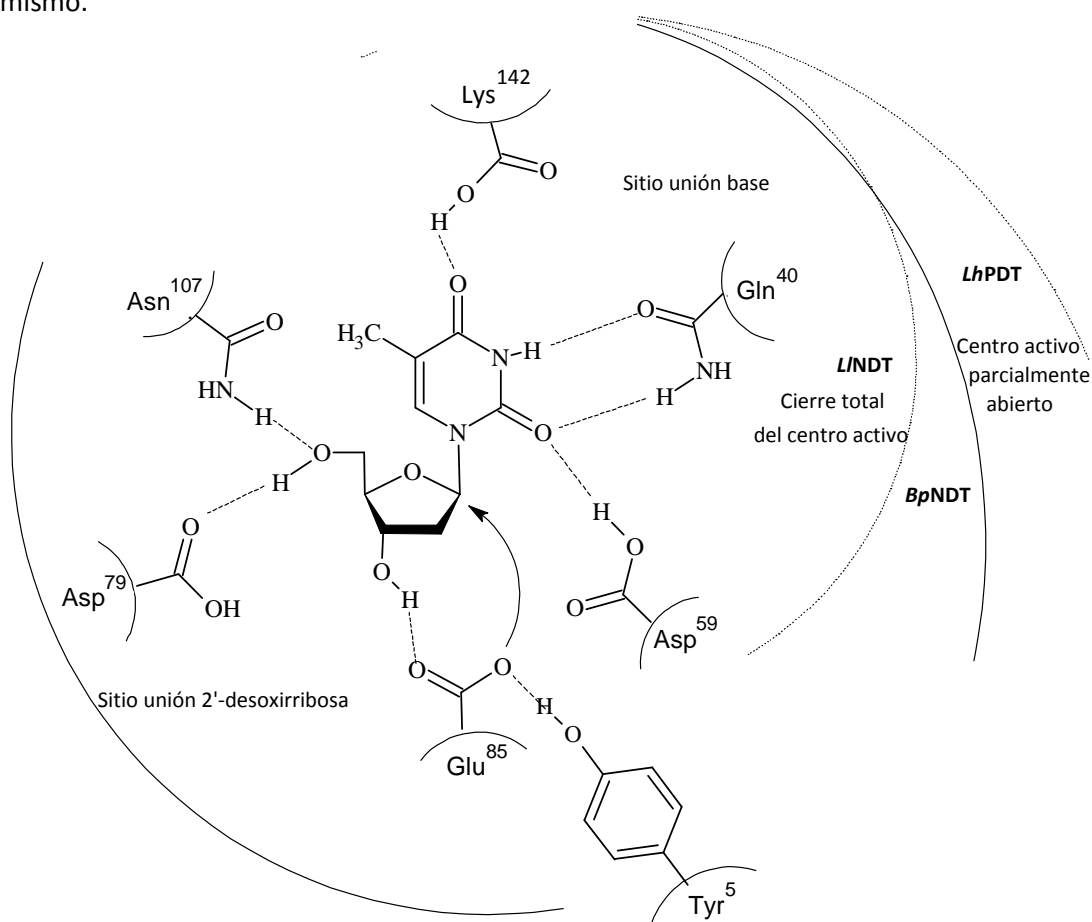
La reacción se produce a través de la formación de un intermedio enzima-desoxirribósido y resulta en la retención de la configuración del nucleósido formado. La transferencia del grupo 2'-desoxirribósido presenta un mecanismo similar a la reacción de doble desplazamiento identificada en las glicosil hidrolasas que retienen la configuración (McCarter et al, 1994), en donde la transferencia del grupo glicosil podría proceder a través de una reacción tipo SN1 o tipo SN2 con la formación de un intermedio covalente enzima-desoxirribosa y cuya etapa limitante es la formación del segundo producto (Fresco-Taboada et al, 2013a).

El estudio de la dependencia de la  $k_{cat}$  de *Bp*NDT con el pH permitió el cálculo de los pKs de los residuos implicados en la catálisis,  $6,8 \pm 0,04$  y  $7,9 \pm 0,16$ ; pudiendo corresponder el primero al Glu catalítico, ya que, aunque es un valor mayor al teórico, podría verse desplazado por el entorno hidrofóbico que presenta el centro activo de *Bp*NDT. Respecto al segundo valor de pK, no se puede asignar a ningún grupo concreto, y habría que llevar a cabo estudios de variación de los parámetros cinéticos con la temperatura y estudios isotópicos para poder determinarlo.

Por otro lado, el mecanismo químico de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas también se ha estudiado. Porter determinó que el Glu<sup>98</sup> es el residuo que actúa como nucleófilo durante la catálisis en la NDT de *L. leichmannii*, ya que la hidrólisis básica de esta enzima en presencia de dFDAP (2,6-diamino-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-B-D-arabinofuranosil)-9H-purina), un inhibidor, libera dos fragmentos cortados por la posición 98. Además, al sustituir ese residuo por una

alanina la actividad es nula (Porter et al, 1995). Asimismo, el Asp<sup>92</sup> y la Asn<sup>123</sup> de *L/NDT* están implicados en orientar el grupo 2'-desoxirribosa al formar enlaces de hidrógeno con el O5' del azúcar; mientras que Gln<sup>46</sup>, Asp<sup>72</sup> y Tyr<sup>157</sup> se encargan de interaccionar con la base (Fresco-Taboada et al, 2013a).

En *BpNDT*, el hecho de que la actividad sea nula cuando se mutan cualquiera de los aminoácidos del centro activo indica que todos ellos, Tyr<sup>5</sup>, Gln<sup>40</sup>, Asp<sup>59</sup>, Asp<sup>79</sup>, Glu<sup>85</sup>, Asn<sup>107</sup> y Lys<sup>142</sup>, son imprescindibles para la correcta actividad 2'-desoxirribosiltransferasa de la NDT de *B. psychrosaccharolyticus*. El aminoácido terminal de *BpNDT*, a pesar de la distancia que lo separa del sitio de unión del sustrato, interviene igualmente en el mecanismo de reacción, siendo el carboxilato del aminoácido situado en el C-terminal determinante para la actividad de la enzima, al igual que sucedía en *L/NDT* (Short et al, 1996). Podría estar produciéndose el ajuste inducido de la enzima cuando se encuentra en presencia del sustrato, por lo que la Lys<sup>142</sup> se encontraría alejada en ausencia de sustrato (14,2 Å) pero próxima cuando se une el mismo.



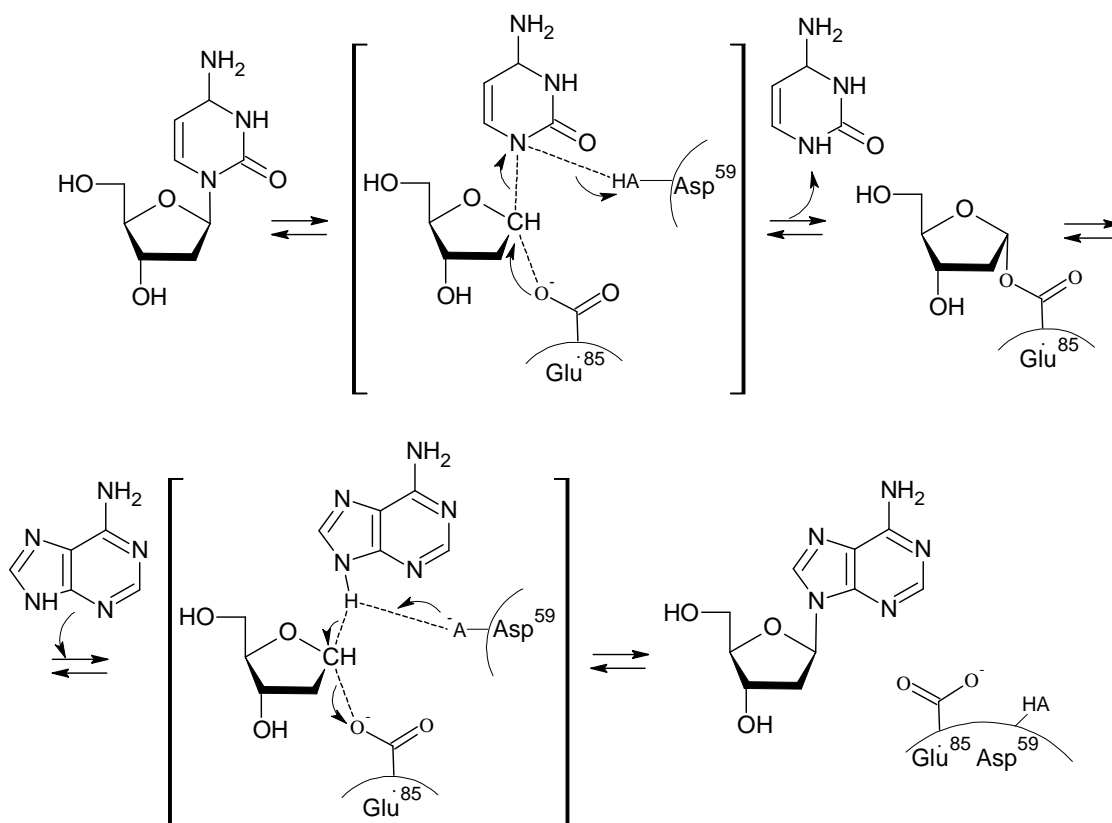
**Figura 72.** Representación de la estructura del centro activo de *BpNDT* con timidina como sustrato en relación al centro activo de *L/NDT* y *LhpDT* (centro activo cerrado y parcialmente abierto respectivamente).

Además, al comparar la disposición del centro activo de *Bp*NDT con el de otras NDTs se concluye que una posible razón por la que *Bp*NDT podría tener mayor preferencia por las purinas es que, como consecuencia de que el giro que actúa como tapadera del centro activo presenta una conformación más abierta que en *L*NDT, este se cierre sobre el mismo de modo más eficaz sobre bases voluminosas. De todos modos, también lleva a cabo la reacción de transferencia con aceptores pirimidínicos porque dicha “tapa” no se encuentra tan abierta como en las PDT (Figura 72).

El mecanismo típico de las glicosiltransferasas que retienen la configuración es aquel en el que tiene lugar una reacción de doble desplazamiento, implicando la formación de un intermedio glicosil-enzima covalente, demandando la existencia de un nucleófilo apropiadamente posicionado en el centro activo (Lairson et al, 2008). Este mecanismo fue descrito por primera vez por Koshland, un mecanismo de doble desplazamiento  $SN_2$  que implica la formación de un intermedio covalente glicosil-enzima (Koshland, 1953). Un mecanismo alternativo,  $SN_1$ , conlleva la formación de un intermedio oxocarbonio que está protegido por una cara por la enzima, promoviendo el ataque nucleofílico desde la cara opuesta del centro de reacción, conllevando a la retención de la configuración anomérica del producto (Lairson et al, 2008).

Además del ácido carboxílico que actúa como nucleófilo, las glicosidasas que retienen la configuración tienen uno o más residuos de aspártico o glutámico que participan en la estabilización del estado de transición o llevan a cabo el papel de ácido/base general (Short et al, 1996). El mecanismo presentado en la figura 73 indica un mecanismo análogo para la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus*, en el que el Glu<sup>85</sup> actúa como residuo nucleófilo que ataca al C1' del azúcar para que se produzca la hidrólisis enzimática de la 2'-desoxicitidina a través de la ruptura del enlace C1'-N1. Este proceso se encuentra facilitado por la protonación de la base saliente, que podría estar catalizada por un residuo ácido de la enzima como el Asp<sup>59</sup>. La pérdida de esta nucleobase produce un intermedio covalente enzima-desoxirribósido a través del Glu<sup>85</sup> de la enzima. Posteriormente, el mismo residuo que ha actuado como ácido en la primera semirreacción actúa como base en la segunda para desprotonar la adenina y permitir la formación de 2'-desoxiadenosina y la liberación de la enzima libre.





**Figura 73.** Mecanismo químico de la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxicitidina y adenina catalizada por la NDT de *Bacillus psychrosaccharolyticus*.

#### 4. Aplicaciones biotecnológicas de *Bp*NDT. Síntesis de nucleósidos de interés terapéutico

El empleo de enzimas para sintetizar nucleósidos modificados es una alternativa interesante a la síntesis química, que implica varios pasos de protección y desprotección de grupos y conlleva a la formación de regio- y estereoisómeros (Zuffi et al, 2004). En la síntesis enzimática de nucleósidos no naturales se pueden emplear tanto nucleósido fosforilasas como 2'-desoxirribosiltransferasas, que presentan como principales ventajas el empleo de condiciones suaves de reacción, la estero y regioselectividad y que se trata de una tecnología limpia con el medio ambiente (Lewkowic et al, 2006; Mikhailopulo, 2007).

La nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *B. psychrosaccharolyticus* libre se ha empleado para sintetizar diversos nucleósidos, tanto naturales como no naturales. Cuatro de estos nucleósidos no naturales fueron sintetizados por primera vez por una NDT: 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5-HMdUrd), 2-fluoro-2'-desoxiadenosina (2-FdAdo), 7-deaza-6-hidroxipurina-2'-

desoxirribósido (7-DHPdRib) y teofilina-2'-desoxirribósido (dTeo). 5-HMdUrd es un profármaco que produce daño en el DNA de células mutantes BRCA1/- y BRCA2/- (Clement et al, 2013) y 2-FdAdo es un profármaco para terapia génica contra células tumorales no proliferativas (Hassan et al, 2000; Parker et al, 2003).

Otros análogos de nucleósidos sintetizados por *Bp*NDT libre con aplicación terapéutica son la 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina), compuesto que ha sido aprobado para el tratamiento del síndrome mielodisplásico (Parker, 2009); la 5-trifluorotimidina (trifluridina), agente antiviral anti-VHS que, combinado con un inhibidor de la timidina fosforilasa se encuentra en ensayos clínicos en fase III contra cáncer colorrectal (Suzuki et al, 2011); la 5-fluoro-2'-desoxiuridina (floxuridina), aprobada para el tratamiento de metástasis hepática (Parker, 2009); o la 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, un potente antiviral contra el virus de la enfermedad de Borna (Bajramovic et al, 2004).

Teniendo en cuenta la potencial aplicación en la industria de *Bp*NDT, la inmovilización de esta enzima es un requisito fundamental, ya que permite su reciclado y aplicación en la síntesis de nucleósidos naturales y modificados en condiciones muy suaves de pH y temperatura (Fresco-Taboada et al, 2013a).

No existen muchos ejemplos de NDTs inmovilizadas, en contraste con las NPs, enzimas cuya inmovilización se ha estudiado a fondo y que han sido aplicadas como biocatalizadores en diversos bioprocesos (Rocchietti et al, 2004; Ubiali et al, 2004; Zuffi et al, 2004). En cuanto a las DRTs, la NDT de *E. coli* se inmovilizó en geles de poliacrilamida activados con glutaraldehído (Gaevaya, 1980), mientras que una preparación de la *L*/NDT se inmovilizó de tres formas, mediante interacción hidrofóbica en octil sefarosa, unión covalente a poliacrilamida-co-N-acriloxisuccinimida (PAN), y atrapamiento empleando K-carragenato (Hicks et al, 1994). Más recientemente, la *Lr*NDT se inmovilizó covalentemente en dos soportes distintos, sobre epoxi-Sepabeads y sobre perlas de quitosano magnéticas, obteniéndose mejor actividad final en el primer caso (65,4 UI/g soporte húmedo frente a 15 UI/g soporte húmedo).

También se han inmovilizado células enteras con actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa, método con el que se evita la purificación de la enzima (Fernández-Lucas et al, 2007), con el inconveniente de que se pueden producir reacciones secundarias indeseadas. Después de llevar a cabo el screening funcional de diversos microorganismos, aquellos con actividad DRT (*B. coagulans* CECT 12, *Lactobacillus* sp. CECT 4219, *B. psychrosaccharolyticus* CECT 4074 y *Psychrobacter immobilis* CECT 4492) se inmovilizaron en pectato cálcico, carragenato potásico, agar, agarosa y poliacrilamida. En 2012 Britos estudió el

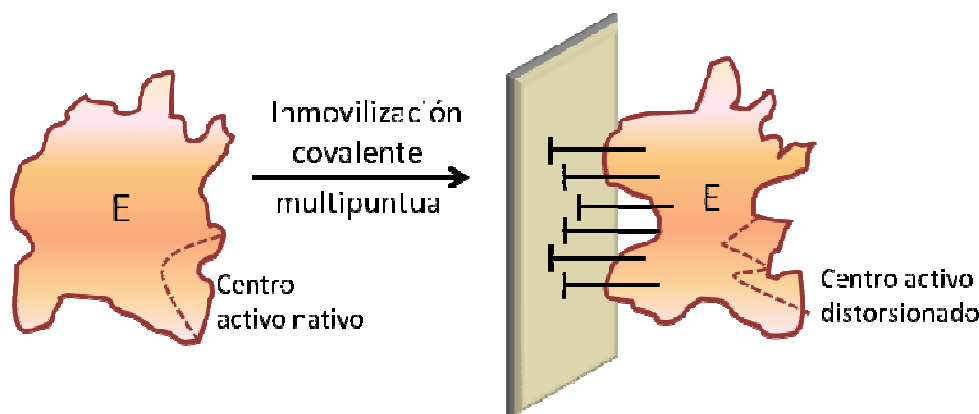
mejor método de inmovilización de las células de *Lactobacillus animalis*, también portadoras de actividad NDT, determinando que los mejores soportes para estas células son alginato y DEAE-sefarosa (Britos et al, 2012).

Respecto a la inmovilización de la NDT de *B. psychrosaccharolyticus*, en primer lugar se abordó la inmovilización de la enzima sobre glioxil agarosa, agarosa que presenta grupos aldehído unidos a la misma por cortos brazos espaciadores, y que ha sido empleada con éxito para la inmovilización covalente de gran número de enzimas y proteínas con bajo impacto en la actividad de la enzima inmovilizada.

La agarosa es un soporte hidrofílico e inerte que está formado por fibras gruesas con un diámetro mucho mayor al de una proteína, por lo que permite múltiples interacciones entre el soporte y los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas de la proteína, que se mantienen durante largos períodos de tiempo. Es necesaria la reducción con borohidruro sódico para transformar las bases de Schiff formadas en enlaces amino secundarios estables, y los grupos aldehído del soporte que no han reaccionado en grupos hidroxilo inertes, previniendo así reacciones no deseadas (Mateo et al, 2006a).

Un factor determinante en el proceso de inmovilización es el tiempo de interacción enzima-soporte. La inmovilización se puede producir en pocos minutos, pero la estabilización puede durar horas, ya que después de las primeras interacciones la enzima pierde flexibilidad, y es más difícil que se generen nuevas. La lipasa de *Candida antarctica* y la penicilina G acilasa de *E. coli* son ejemplos de enzimas que incrementaron su estabilidad notablemente al ser inmovilizadas en glioxil agarosa (Mateo et al, 2006a). Otro parámetro relevante es el grado de activación del soporte, el número de grupos glioxilo/mL de soporte dependerá del porcentaje de agarosa, pero la densidad de grupos glioxilo en la superficie será el mismo, aproximadamente 17 grupos/1000 Å<sup>2</sup>.

Gracias al conocimiento del cristal de BpNDT se puede determinar la posición de las lisinas en la enzima y su disposición respecto al centro activo, observándose que ninguna de ellas se dispone hacia el centro activo, por lo que la inmovilización no debería eliminar la actividad de BpNDT. A pesar de ello, la inmovilización covalente sobre glioxil agarosa no es una técnica adecuada para inmovilizar BpNDT, al igual que sucede con otras nucleósido fosforilasas multiméricas, que también pierden su actividad al ser inmovilizadas sobre glioxil-agarosa. Este efecto se debe probablemente a la distorsión provocada por las uniones multipuntuales entre la enzima y la agarosa activada (Figura 74), o incluso a la disociación de sus subunidades (Rocchietti et al, 2004; Serra et al, 2011).



**Figura 74.** Distorsión del centro activo provocado por la inmovilización covalente multipuntual de una enzima a un soporte muy activado.

Otra razón por la que puede producirse la pérdida de actividad de *Bp*NDT es por la necesidad de llevar a cabo el proceso de inmovilización a pH alcalino (pH 10), para que los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas se vuelvan más reactivos. El inconveniente de un pH elevado es que la proteína pueda interactuar con el soporte a través del grupo amino terminal mucho más reactivo, y no mediante áreas ricas en lisinas. *Bp*NDT podría unirse al soporte a través de la Lys<sup>142</sup>, situada en el extremo N-terminal y muy expuesta al medio (Figura 69), provocando su desactivación, ya que la delección de este residuo produce la pérdida total de la actividad de la enzima. Además, la estabilidad y actividad de *Bp*NDT disminuyen considerablemente a valores de pH mayores a 9.

Para evitar este tipo de inmovilización covalente, y por tanto la pérdida de la estructura cuaternaria de *Bp*NDT, se procedió a unir no covalentemente dicha enzima sobre soportes (glioxil-agarosa y Sepabeads EC-EP), funcionalizados con polietilenimina (PEI).

Sepabeads EC-EP es un soporte polimérico rígido, de forma esférica, con diámetro de poro 10-20 nm, que puede ser usado en tanques con agitación, no se hincha cuando es hidratado y ofrece amplia superficie interna para que se una la enzima (los poros internos están rodeados de superficies convexas para generar poros cilíndricos). Además, tiene en su superficie una capa de grupos epóxido muy reactiva (100  $\mu\text{mol/g}$  de soporte húmedo) (Mateo et al, 2002), susceptible de ser funcionalizada con PEI, permitiendo la obtención de un soporte que puede ser utilizado en la adsorción iónica de enzimas.

El valor de punto isoeléctrico de *Bp*NDT es 4,6, por lo que tendrá carga negativa al pH al que se produce la inmovilización no covalente, 7,5, lo que permite la interacción iónica con las cargas positivas de la polietilenimina. Los resultados mostrados en la tabla 16 indicaron que,

independientemente del soporte empleado, la interacción iónica se produce sin afectar a la estructura hexamérica de la enzima, por lo que preserva su actividad catalítica.

La razón de que *Bp*NDT retenga actividad cuando se inmoviliza de forma iónica sobre un soporte flexible, pero no cuando se inmoviliza covalentemente, puede residir en que el primer caso permite mayor movimiento a la enzima y no se forman enlaces tan restringidos, mientras que en el segundo los enlaces covalentes multipuntuales producen la distorsión del centro activo (Serra et al, 2013b) (Figura 74).

Sin embargo, en los biocatalizadores inmovilizados obtenidos mediante adsorción iónica de enzimas a soportes cargados se puede producir la liberación de la enzima del soporte, causando la contaminación del producto. Este hecho es un inconveniente importante a escala industrial, ya que, cuando los nucleósidos sintetizados son para uso humano, la presencia de impurezas debe estar estrictamente controlada para garantizar la calidad definida por las autoridades reguladoras en el uso de ingredientes farmacéuticamente activos (API, *active pharmaceutical ingredients*) (Terreni et al, 2008). Por este motivo, las técnicas de post-inmovilización, como el entrecruzamiento con dextrano aldehídico de enzimas adsorbidas a soportes cargados, están consideradas como una estrategia eficaz para superar esos problemas (Fernández-Lafuente et al, 1999). Este sistema se ha empleado en el caso de *Bs*PyNP (Rocchietti et al, 2004) y *Ec*TP (Serra et al, 2011), permitiendo la preparación de biocatalizadores activos en la transglicosilación enzimática (Ubiali et al, 2004). Se ha empleado la misma técnica sobre el derivado por adsorción iónica de *Bp*NDT, obteniéndose mejor resultado cuando el soporte empleado es agarosa, probablemente debido a la distinta naturaleza del soporte respecto a Sepabeads (Fresco-Taboada et al, 2014).

A nivel industrial, a pesar de los esfuerzos realizados para extender la aplicación de enzimas para la síntesis de nucleósidos (principalmente nucleósido fosforilasas), los análogos de nucleósidos siguen sintetizándose mediante métodos químicos convencionales. A pesar de que una razón importante es la estricta especificidad de sustrato de las enzimas, la baja estabilidad del biocatalizador también es fundamental (Serra et al, 2013b). Por esta razón, el derivado inmovilizado de *Bp*NDT debe presentar un compromiso entre actividad y estabilidad bajo diferentes condiciones.

La primera condición en la que el derivado no debe perder totalmente su actividad es el pH alcalino, pH 10, ya que en el momento del escalado puede ser necesario para llevar a cabo síntesis cuyos sustratos presentan baja solubilidad y a la vez evitar el uso de solventes orgánicos (Serra et al, 2011). Tanto el derivado inmovilizado por adsorción iónica como el

entrecruzado con el dextrano de mayor masa molecular pierden totalmente la actividad, indicando que la inmovilización por adsorción iónica no confiere estabilidad a la enzima y que el dextrano debe tener un tamaño apropiado para no disminuir o anular la estabilidad de la enzima. Cuando el tamaño del dextrano es el adecuado, la rigidez que confiere el mismo también debe tenerse en cuenta, ya que cuanto mayor es el número de enlaces entre el polímero y la enzima inmovilizada, mayor es la estabilidad del derivado (Figura 62). Cabe resaltar el mantenimiento del 60 % de la actividad de la enzima soluble, ya que muchas enzimas pierden totalmente su actividad a pH 10, como por ejemplo *AhpNP* o *BsPyNP*. La inmovilización iónica y el entrecruzamiento con dextrano 100 kDa de *AhpNP* conllevó también a la pérdida total de la actividad a pH 10 (Serra et al, 2013b), mientras que *BsPyNP* fue estabilizada únicamente cuando se inmovilizó en Sepabeads-PEI y se entrecruzó con dextrano 20 kDa oxidado al 20 % (Rocchietti et al, 2004).

En ocasiones el pH 10 no es adecuado para la síntesis de nucleósidos debido a la imposibilidad de operar con concentraciones elevadas de sustratos, por lo que se debe usar una pequeña proporción de disolvente orgánico, como dimetilformamida, para permitir la solubilización de los sustratos, principalmente halogenados. Al estudiar el comportamiento de *BpNDT* en presencia de 20 % de DMF, se repite el observado a pH 10, ni el derivado inmovilizado por adsorción iónica ni el entrecruzado con dextrano 100 kDa se encuentran estabilizados, mientras que al emplear el dextrano 20 kDa sí se recupera la actividad de la enzima soluble. En este sentido cabe destacar la gran estabilidad de la enzima soluble en estas condiciones, superior a la enzima inmovilizada (Figura 63). El mismo patrón se observa en *BsPyNP* y *EcTP* cuando se encuentran inmovilizadas sobre Sepabeads-PEI y dextrano aldehídico, con una estabilidad del derivado muy similar a la que presenta la enzima soluble (Serra et al, 2013a).

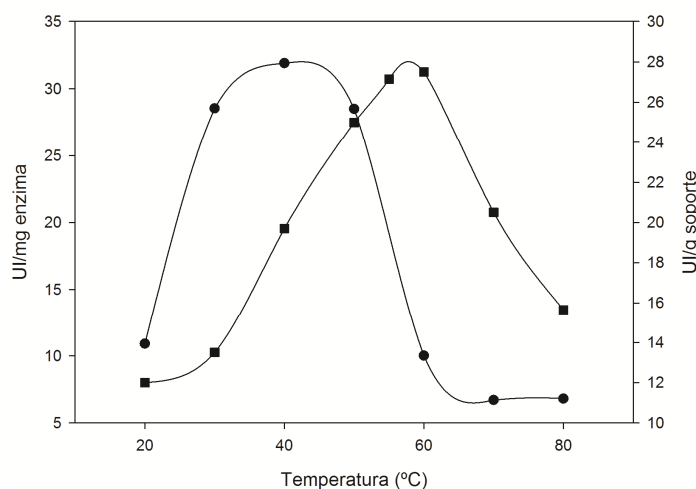
El hecho de que no se estabilice el derivado inmovilizado respecto a la enzima soluble podría deberse, además de a la alta estabilidad de la enzima libre *per se*, a la estructura hexamérica de *BpNDT*, en la que cada centro activo está compuesto por aminoácidos de dos subunidades distintas, por lo que la distorsión que produce el proceso de inmovilización puede afectar en mayor medida a la actividad y estabilidad de la enzima. Las fosforilasas estabilizadas hasta el momento mediante interacción iónica y posterior entrecruzamiento con dextrano aldehídico no presentan una estructura tan compleja, ya que son trímeros o dímeros (Rocchietti et al, 2004; Serra et al, 2011).

A pesar de la gran estabilidad de *BpNDT* soluble, a nivel industrial es preferible el uso de *BpNDT* inmovilizada en presencia de 20 % de glicerol sobre agarosa-PEI 600 Da entrecruzada

con dextrano 20 kDa oxidado al 70 % (DABpNDT10), ya que permite la reutilización del derivado durante al menos 30 ciclos sin pérdida significativa de la actividad.

Por último, se estudió el efecto de la temperatura sobre el derivado inmovilizado escogido anteriormente. Al observar la actividad del biocatalizador inmovilizado a diferentes temperaturas (Figura 75) cabría esperar que se encuentre estabilizado respecto a la enzima libre en tampón HEPES 50 mM pH 8, ya que la temperatura óptima se incrementa 20 °C y además retiene 58 % de su actividad máxima a 80 °C, mientras que en esas condiciones la soluble retiene solamente 20 %.

Además, se calculó la energía de activación de *Bp*NDT aplicando la ecuación de Arrhenius, ecuación [3] (apartado 12 de Materiales y Métodos), con los datos experimentales del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima en tampón HEPES 50 mM pH 8, 36,0 kJ/mol. Este mismo dato se calculó para el derivado inmovilizado, obteniéndose el valor de 23,2 KJ/mol. Es decir, la inmovilización de *Bp*NDT implica una catálisis más eficaz, ya que la energía necesaria para producir la reacción disminuye un 25 %.



**Figura 75.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de *Bp*NDT. (●) *Bp*NDT soluble; (■) *Bp*NDT inmovilizada, DABpNDT10. Condiciones de reacción: dUrd y Ade 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8 a distintas temperaturas durante 5 min.

Al comparar con otras nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas inmovilizadas, la máxima actividad de *Lr*NDT inmovilizada covalentemente en Sepabeads EC-EP se alcanzó a 40 °C y pH 6.5 (Fernández-Lucas et al, 2011), mientras que la misma enzima inmovilizada de forma covalente sobre perlas magnéticas de quitosano mostró máxima actividad a 60 °C y pH 6,5

(Fernández-Lucas et al, 2013). Estos resultados indican que el tipo de soporte sobre el que se lleva a cabo la inmovilización influye en las propiedades del derivado final.

Bolívar estudió el efecto de la temperatura sobre la enzima formato deshidrogenasa de *Pseudomonas sp. 101* al inmovilizarla sobre distintos soportes de inmovilización, y llegó a la conclusión de que la inmovilización reversible mediante adsorción iónica en soportes aniónicos como agarosa-PEI no estabilizan frente a la temperatura; mientras que la inmovilización covalente sobre glioxil-agarosa sí lo hace (Bolivar et al, 2006). Este hecho se ve refrendado por los resultados obtenidos para *Bp*NDT, ya que el estudio de inactivación térmica indica una pérdida de estabilidad frente a la temperatura del derivado respecto a la enzima libre (Figura 60).

Los análogos de nucleósidos elegidos para comprobar la capacidad de síntesis de nucleósidos modificados del derivado inmovilizado de *DABp*NDT10 fueron 5-trifluorotimidina, 5-aza-2'-desoxicitidina y 5-aza-2'-desoxiuridina.

La trifluorotimidina, también conocida como trifluridina, es un agente antiviral contra el virus del herpes simple (VHS) empleado principalmente sobre el ojo, aunque también induce cortes en el DNA e inhibe la timidilato sintasa al ser fosforilado por la timidilato quinasa (Suzuki et al, 2011). La combinación de este compuesto con el inhibidor de la timidina fosforilasa *tipiracil* se encuentra en Fase III de un ensayo clínico con pacientes que sufren cáncer colorectal metastásico refractario (ClinicalTrials. gov identifier: NCT01607957).

La 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) es eficaz contra distintos tipos de tumores al incorporarse al DNA e inhibir su metilación (Christman, 2002), lo que resulta en un aumento de la expresión génica (Parker, 2009). La 5-aza-2'-desoxiuridina complementa la acción del análogo de nucleósido anterior, ya que interfiere en la síntesis *de novo* de timidina 5'-monofosfato, incrementando la citotoxicidad (Christman, 2002).

A pesar de la imposibilidad de sintetizar este último compuesto, el derivado inmovilizado de *Bp*NDT es un buen candidato para llevar a cabo la síntesis de decitabina y trifluridina a nivel industrial; ya que no se han descrito fosforilasas capaces de sintetizar decitabina, y el rendimiento en cuanto a la síntesis de trifluridina a partir de concentraciones de sustrato elevadas a escala de laboratorio (10-30 mM) es mayor al descrito empleando *BsPy*NP o *Ec*TP (Serra et al, 2013a).





## **VI. CONCLUSIONES**



En función de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074, aunque está definido como microorganismo psicrófilo, debe ser clasificado como psicrotolerante, ya que es capaz de crecer a 0 °C pero su temperatura óptima de crecimiento es superior a 15 °C (28 °C). Además, es el primer microorganismo psicrotolerante del género *Bacillus* cuyo genoma que ha sido secuenciado, permitiendo la identificación de genes hipotéticos que codifican proteínas implicadas en mecanismos de adaptación al frío, como son los factores de elongación de la transcripción G, Tu, Ts, LepA y P o 6 helicasas de RNA dependientes de ATP.
2. El gen *Bpndt* codifica la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 (*Bp*NDT), que ha sido clasificada como DRT de tipo II, ya que cataliza la transferencia del grupo 2'-desoxirribosa entre bases púricas y/o pirimidínicas.
3. *Bp*NDT es una enzima psicrotolerante que presenta actividad por debajo de 20 °C, estable a 50 °C durante al menos 96 h y con una temperatura de desnaturalización de 49 °C. Las condiciones óptimas para la actividad transferasa de *Bp*NDT son 40 °C y pH 8 en ausencia de cationes.
4. *Bp*NDT es un homohexámero de 91,4 kDa cuyas subunidades se disponen como trímero de dímeros, formadas por 36 % de  $\alpha$ -hélice, 16 % de lámina  $\beta$  y 16 % de giros  $\beta$ . Cada dímero, cuyas subunidades se disponen de forma antiparalela, presenta dos centros activos, participando en cada uno de ellos aminoácidos de las dos subunidades del dímero, Tyr<sup>5</sup>, Gln<sup>40</sup>, Asp<sup>59</sup>, Asp<sup>79</sup> y Glu<sup>85</sup> de una de ellas y Asn<sup>107</sup> y Lys<sup>142</sup> de la otra.
5. *Bp*NDT presenta mecanismo cinético Ping-Pong Bi-Bi con formación de un intermedio glicosil-enzima cuya etapa limitante es la formación del segundo producto. Respecto a su mecanismo químico, se produce una catálisis ácido-base donde el Glu<sup>85</sup> actúa como nucleófilo que ataca al C1' de la 2'-desoxirribosa, mientras que un residuo ácido como el Asp<sup>59</sup> actúa como ácido que protona la base saliente en la primera semireacción y como base en la segunda.
6. En lo que respecta a la síntesis de nucleósidos naturales, *Bp*NDT muestra preferencia por las bases púricas como aceptores (Hyp>Ade>Cyt>Thy≈Ura) y por los nucleósidos pirimidínicos como donadores (dCyd>dUrd≈Thd≈dAdo>dGua>dIno). En cuanto a la síntesis de nucleósidos

no naturales, *Bp*NDT reconoce las bases modificadas, pero no los nucleósidos modificados en la 2'-desoxirribosa, a excepción de la 2'-fluoro-2'-desoxiuridina. Al igual que sucede con los sustratos naturales, reconoce mejor las bases modificadas voluminosas debido a que la conformación del centro activo se sitúa entre la de NDTs de tipo I y tipo II.

7. *Bp*NDT es capaz de sintetizar nucleósidos de interés terapéutico como trifluridina, decitabina, floxuridina, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina o 2-fluoro-2'-desoxiadenosina. Los compuestos 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina, 2-fluoro-2'-desoxiadenosina, 7-deaza-6-hidroxipurina-2'-desoxirribósido y teofilina-2'-desoxirribósido han sido sintetizados por primera vez por una NDT.

8. *Bp*NDT ha sido inmovilizada en glioxil-agarosa funcionalizada con polietilenimina 600 Da y entrecruzado posteriormente con dextrano aldehídico (20 kDa) oxidado al 70 %. Este biocatalizador inmovilizado se puede reutilizar durante al menos 30 ciclos de transglicosilación, presenta actividad máxima a 60 °C y se ha empleado en la síntesis de nucleósidos no naturales de interés terapéutico como la 5-trifluorotimidina (trifluridina) o la 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina).

## **VII. CONCLUSIONS**



According to the results obtained in this Doctoral Thesis, the following conclusions can be drawn:

1. Despite being defined as a psychrophilic microorganism, *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 should be classified as psychrotolerant, because it reaches its optimal growth at a higher temperature than 15 °C (28 °C) although it is able to grow at 0 °C. Furthermore, genomic DNA from *Bacillus psychrosaccharolyticus* has been sequenced. It is the first genome from a psychrotolerant microorganism from the *Bacillus* genus, allowing identification of hypothetical genes codifying for proteins involved in cold-shock response, such as elongation factors G, Ts, Tu, LepA and P, or 6 ATP-dependent RNA helicases.
2. *Bpndt* gene codifies the nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase from *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 (*Bp*NDT). This enzyme has been classified as a DRT type II, since it catalyzes the 2'-deoxyribosyl transfer between purines and/or pyrimidines.
3. *Bp*NDT is a psychrotolerant enzyme that presents activity under 20 °C, a melting temperature of 49 °C and is stable at 50 °C for at least 96 h. Optimal conditions for *Bp*NDT transferase activity are 40 °C and pH 8 in absence of any cation.
4. *Bp*NDT is a homohexamer of 91.4 kDa that can be described as a trimer of dimers, composed by 36 % of  $\alpha$ -helix, 16 % of  $\beta$ -sheet and 16 % of  $\beta$ -turns. Each dimer, consisting of 2 antiparallel subunits, presents two active sites, each one formed by residues from both subunits of the dimer; Tyr<sup>5</sup>, Gln<sup>40</sup>, Asp<sup>59</sup>, Asp<sup>79</sup> and Glu<sup>85</sup> from one of them, and Asn<sup>107</sup> and Lys<sup>142</sup> from the other.
5. *Bp*NDT presents a Ping-Pong Bi-Bi kinetic mechanism where a glycosyl-enzyme intermediate is formed. Regarding its chemical mechanism, *Bp*NDT performs acid-base catalysis, nucleophile Glu<sup>85</sup> attacks C1' of the 2'-deoxyribose whereas an acid residue, which could be Asp<sup>59</sup>, acts as acid in the first semireaction, protonating the leaving base, and as base in the second semireaction.
6. Regarding natural nucleoside synthesis, *Bp*NDT prefers purine bases as acceptors (Hyp>Ade>Cyt>Thy≈Ura) and pyrimidine nucleosides as donors (dCyd>dUrd≈Thd≈dAdo>dGua>dIno). Concerning non-natural nucleoside synthesis, *Bp*NDT recognizes modified bases but not nucleoside donors with modifications in the 2'-deoxyribosyl group, with the exception of 2'-fluoro-2'-deoxyuridine. Similar to natural substrates, *Bp*NDT



recognizes better bulky modified bases due to active core conformation, situated between type I and type II NDTs.

7. *Bp*NDT is able to synthesize therapeutic nucleoside analogs such as trifluridine, decytabine, floxuridine, 2'-fluoro-2'-deoxycytidine or 2-fluoro-2'-deoxyadenosine. 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, 2-fluoro-2'-deoxyadenosine, 7-deaza-6-hydroxypurine-2'-deoxyriboside and theophylline-2'-deoxyriboside were synthesized for the first time by a NDT.

8. *Bp*NDT was immobilized on PEI 600 Da-functionalized glyoxyl-agarose and further cross-linked with 70 % oxidized 20 kDa dextran. This immobilized biocatalyst can be recycled for at least 30 cycles of transglycosylation reaction, reaches maximal activity at 60 °C and it has been employed for the synthesis of two therapeutic non-natural nucleosides, 5-trifluorothymidine (trifluridine) and 5-aza-2'-deoxycytidine (decytabine).

## **VIII. REFERENCIAS**



- Adams P., Afonine P., Bunkóczi G., Chen V., Davis I., Echols N., Headd J., Hung L.-W., Kapral G., Grosse-Kunstleve R., McCoy A., Moriarty N., Oeffner R., Read R., Richardson J., Terwilliger T. y Zwart P.** (2010) "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution" *Acta Crystallogr*, D66.
- Ahern T. y Klibanov A.** (1985) "The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100 °C" *Science*, 228, 1280-1284.
- Alfaro-Ureña Y.** (2012) "Nueva nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila*" *Bioquímica y Biología Molecular I*, Universidad Complutense de Madrid.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J.** (1990) "Basic local alignment search tool" *J Mol Biol*, 215, 403-410.
- Anand R., Kaminski P.A. y Ealick S.E.** (2004) "Structures of purine 2'-deoxyribosyltransferase, substrate complexes, and the ribosylated enzyme intermediate at 2.0 Å resolution" *Biochemistry*, 43, 2384-2393.
- Armstrong S.R., Cook W.J., Short S.A. y Ealick S.E.** (1996) "Crystal structures of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase in native and ligand-bound forms reveal architecture of the active site" *Structure*, 4, 97-107.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J. y Schwede T.** (2006) "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling" *Bioinformatics*, 22, 195-201.
- Arroyo M.** (2001) "Tecnología enzimática aplicada", Editorial Complutense, Madrid.
- Auburn S., Campino S., Clark T.G., Djimde A.A., Zongo I., Pinches R., Manske M., Mangano V., Alcock D., Anastasi E., Maslen G., MacInnis B., Rockett K., Modiano D., Newbold C.I., Doumbo O.K., Ouédraogo J.B. y Kwiatkowski D.P.** (2011) "An effective method to purify *Plasmodium falciparum* DNA directly from clinical blood samples for Whole Genome High-Throughput Sequencing" *PLoS ONE*, 6, e22213.
- Avraham Y., Grossowicz N. y Yashphe J.** (1990) "Purification and characterization of uridine and thymidine phosphorylase from *Lactobacillus casei*" *Biochim Biophys Acta*, 1040, 287-293.
- Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A. y Zagnitko O.** (2008) "The RAST server: rapid annotations using subsystems technology" *Bmc Genomics*, 9, 15.
- Bajramovic J.J., Volmer R., Syan S., Pochet S. y Gonzalez-Dunia D.** (2004) "2'-fluoro-2'-deoxycytidine inhibits Borna disease virus replication and spread" *Antimicrob Agents Chem*, 48, 1422-1425.
- Bartolomé B., Jubete Y., Martínez E. y de la Cruz F.** (1991) "Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives" *Gene*, 102, 75-78.
- Bertani G.** (1951) "Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*" *J Bacteriol*, 62, 293-300.
- Bertelli C. y Greub G.** (2013) "Rapid bacterial genome sequencing: Methods and applications in clinical microbiology" *Clin Microbiol Infec*, 19, 803-813.
- Bickerstaff G., Jr.** (1997) "Immobilization of enzymes and cells" En *Immobilization of Enzymes and Cells*, Vol. 1, 1-11, Humana Press.
- Bohm G., Muhr R. y Jaenicke R.** (1992) "Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks." *Protein Eng*, 5, 191-195.
- Bolivar J.M., Rocha-Martin J., Mateo C., Cava F., Berenguer J., Fernandez-Lafuente R. y Guisan J.M.** (2009) "Coating of soluble and immobilized enzymes with ionic polymers: Full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes" *Biomacromolecules*, 10, 742-747.
- Bolivar J.M., Wilson L., Ferrarotti S.A., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. y Mateo C.** (2006) "Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports" *Biomacromolecules*, 7, 669-673.

- Boryski J.** (2008) "Reactions of transglycosylation in the nucleoside chemistry" *Curr Org Chem*, 12, 309-325.
- Bosch J., Robien M.A., Mehlin C., Boni E., Riechers A., Buckner F.S., Van Voorhis W.C., Myler P.J., Worthey E.A., DeTitta G., Luft J.R., Lauricella A., Gulde S., Anderson L.A., Kalyuzhnyi O., Neely H.M., Ross J., Earnest T.N., Soltis M., Schoenfeld L., Zucker F., Merritt E.A., Fan E., Verlinde C.L.M.J. y Hol W.G.J.** (2006) "Using fragment cocktail crystallography to assist inhibitor design of *Trypanosoma brucei* nucleoside 2-deoxyribosyltransferase" *J Med Chem*, 49, 5939-5946.
- Bradford M.M.** (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal Biochem*, 72:248-54.
- Brady D. y Jordaan J.** (2009) "Advances in enzyme immobilisation" *Biotechnol Lett*, 31, 1639-1650.
- Brena B.M. y Batista-Viera F.** (2006) "Immobilization of Enzymes. A Literature survey" En *Immobilization of Enzymes and Cells*, Vol. 22, 15-30, Humana Press.
- Breton C., Šnajdrová L., Jeanneau C., Koča J. y Imberty A.** (2006) "Structures and mechanisms of glycosyltransferases" *Glycobiology*, 16, 29-37.
- Britos C.N., Cappa V.A., Rivero C.W., Sambeth J.E., Lozano M.E. y Trelles J.A.** (2012) "Biotransformation of halogenated 2'-deoxyribosides by immobilized lactic acid bacteria" *J Mol Catal B-Enzym*, 79, 49-53.
- Broder C.C.** (2012) "Henipavirus outbreaks to antivirals: The current status of potential therapeutics" *Curr Opin Virol*, 2, 176-187.
- Brown P.H. y Schuck P.** (2006) "Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation" *Biophys J*, 90, 4651-4661.
- Bzowska A., Kulikowska E. y Shugar D.** (2000) "Purine nucleoside phosphorylases: Properties, functions, and clinical aspects" *Pharmacol Therapeut*, 88, 349-425.
- Cabrera-Padilla R., Lisboa M., Fricks A., Franceschi E., Lima A., Silva D. y Soares C.F.** (2012) "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support" *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39, 289-298.
- Cacciapuoti G., Porcelli M., Bertoldo C., De Rosa M. y Zappia V.** (1994) "Purification and characterization of extremely thermophilic and thermostable 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Purine nucleoside phosphorylase activity and evidence for intersubunit disulfide bonds" *J Biol Chem*, 269, 24762-24769.
- Canduri F., dos Santos D.M., Silva R.G., Mendes M.A., Basso L.A., Palma M.S., de Azevedo W.F. y Santos D.S.** (2004) "Structures of human purine nucleoside phosphorylase complexed with inosine and ddi" *Biochem Biophys Res Commun*, 313, 907-914.
- Cano-Soldado P. y Pastor-Anglada M.** (2012) "Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition" *Med Res Rev*, 32, 428-457.
- Cao L.** (2005) "Covalent Enzyme Immobilization" En *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, 169-316, Wiley-VCH.
- Cao L., Janssen M.H.A., Langen L.M. y Sheldon R.A.** (2001) EP19990203117.
- Caradoc-Davies T.T., Cutfield S.M., Lamont I.L. y Cutfield J.F.** (2004) "Crystal structures of *Escherichia coli* uridine phosphorylase in two native and three complexed forms reveal basis of substrate specificity, induced conformational changes and influence of potassium" *J Mol Biol*, 337, 337-354.
- Casanueva A., Tuffin M., Cary C. y Cowan D.A.** (2010) "Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies" *Trends Microbiol*, 18, 374-381.
- Cavicchioli R., Charlton T., Ertan H., Omar S.M., Siddiqui K.S. y Williams T.J.** (2011) "Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles" *Microb Biotechnol*, 4, 449-460.
- Clement J. y Nakamura J.** (2013) "5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, but not temozolomide, enhances the selective synthetic lethality in BRCA1 and BRCA2- deficient cells caused by PARP inhibition" *Cancer Res*, 73, Supplement 1.

- Cole C., Barber J.D. y Barton G.J.** (2008) "The Jpred 3 secondary structure prediction server" *Nucleic Acids Res*, 36, W197-W201.
- Cole J.L.** (2004) "Analysis of heterogeneous interactions" *Method Enzymol*, 384, 212-232.
- Cook P. y Cleland W.** (2007) "Enzyme kinetics and mechanism", Garland Science.
- Cook W.J., Short S.A. y Ealick S.E.** (1990) "Crystallization and preliminary X-ray investigation of recombinant *Lactobacillus leichmannii* nucleoside deoxyribosyltransferase" *J Biol Chem*, 265, 2682-2683.
- Chang A., Singh S., Phillips G.N., Jr. y Thorson J.S.** (2011) "Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation" *Curr Opin Biotechnol*, 22, 800-808.
- Chen Y.-Y., Tsai M.-G., Chi M.-C., Wang T.-F. y Lin L.-L.** (2013) "Covalent immobilization of *Bacillus licheniformis*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase on aldehyde-functionalized magnetic nanoparticles" *Int J Mol Sci*, 14, 4613-4628.
- Christman J.K.** (2002) "5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy" *Oncogene*, 21, 5483-5495.
- Dalluge J., Hamamoto T., Horikoshi K., Morita R., Stetter K. y McCloskey J.** (1997) "Posttranscriptional modification of tRNA in psychrophilic bacteria" *J Bacteriol*, 179, 1918-1923.
- Dandanell G., Szczepanowski R.H., Kierdaszuk B., Shugar D. y Bochtler M.** (2005) "*Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase II, the product of the xapA gene" *J Mol Biol*, 348, 113-125.
- Danzin C. y Cardinaud R.** (1974) "Deoxyribosyl transfer catalysis with trans-N-deoxyribosylase. Kinetic studies of purine-to-purine trans-N-deoxyribosylase" *Eur J Biochem*, 48, 255-262.
- Danzin C. y Cardinaud R.** (1976) "Deoxyribosyl transfer catalysis with trans-N-deoxyribosylase" *Eur J Biochem*, 62, 365-372.
- Datta S., Christena L.R. y Rajaram Y.** (2013) "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials" *3 Biotech*, 3, 1-9.
- de Giuseppe P.O., Martins N.H., Meza A.N., dos Santos C.R., Pereira H.D. y Murakami M.T.** (2012) "Insights into phosphate cooperativity and influence of substrate modifications on binding and catalysis of hexameric purine nucleoside phosphorylases" *PLoS One*, 7, e44282.
- DeLano W.L.** "The PyMOL molecular graphics system", version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.
- Desgranges C., Razaka G., Rabaud M. y Bricaud H.** (1981) "Catabolism of thymidine in human blood platelets purification and properties of thymidine phosphorylase" *BBA - Nucleic Acids Protein Synth*, 654, 211-218.
- Donkor E.** (2013) "Sequencing of bacterial genomes: Principles and insights into pathogenesis and development of antibiotics" *Genes*, 4, 556-572.
- Dower W.J., Miller J.F. y Ragsdale C.W.** (1988) "High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation" *Nucleic Acids Res*, 16, 6127-6145.
- Duan J., Heikkilä J. y Glick B.** (2010) "Sequencing a bacterial genome: an overview" En *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 2, 1443-1451, Formatex Research Center.
- Duchaud E., Boussaha M., Loux V., Bernardet J.-F., Michel C., Kerouault B., Mondot S., Nicolas P., Bossy R., Caron C., Bessieres P., Gibrat J.-F., Claverol S., Dumetz F., Henaff M.L. y Benmansour A.** (2007) "Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*" *Nat Biotechnol*, 25, 763-769.
- Edelhoch H.** (1967) "Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins" *Biochemistry*, 6, 1948-1954.
- Eppinger M., Bunk B., Johns M.A., Edirisinghe J.N., Kutumbaka K.K., Koenig S.S., Creasy H.H., Rosovitz M.J., Riley D.R., Daugherty S., Martin M., Elbourne L.D., Paulsen I., Biedendieck R., Braun C., Grayburn S., Dhingra S., Lukyanchuk V., Ball B., Ul-Qamar R., Seibel J., Bremer E.,**

- Jahn D., Ravel J. y Vary P.S. (2011) "Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319" *J Bacteriol*, 193, 4199-4213.
- Ermolenko D.N. y Makhatadze G.I. (2002) "Bacterial cold-shock proteins" *Cell Mol Life Sci*, 59, 1902-1913.
- Evans P. (2006) "Scaling and assessment of data quality" *Acta Crystallogr D*, 62, 72-82.
- Ewald B., Sampath D. y Plunkett W. (2008) "Nucleoside analogs: Molecular mechanisms signaling cell death" *Oncogene*, 27, 6522-6537.
- Feller G. (2013) "Psychrophilic enzymes: From folding to function and biotechnology" *Scientifica*, 2013, 1-28.
- Fernández-Lafuente R. (2009) "Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation" *Enzyme Microb Tech*, 45, 405-418.
- Fernández-Lafuente R., Rodríguez V., Mateo C., Penzol G., Hernández-Justiz O., Irazoqui G., Villarino A., Ovsejevi K., Batista F. y Guisán J.M. (1999) "Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques" *J Mol Catal B-Enzym*, 7, 181-189.
- Fernández-Lucas J., Acebal C., Sinisterra J.V., Arroyo M. y de la Mata I. (2010) "*Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides" *Appl Environ Microbiol*, 76, 1462-1470.
- Fernández-Lucas J., Condezo L.A., Martínez-Lagos F. y Sinisterra J.V. (2007) "Synthesis of 2'-deoxyribosyl nucleosides using new 2'-deoxyribosyltransferase microorganism producers" *Enzyme Microb Technol*, 40, 1147-1155.
- Fernández-Lucas J., Fresco-Taboada A., Acebal C., de la Mata I. y Arroyo M. (2011) "Enzymatic synthesis of nucleoside analogues using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus reuteri*" *Appl Microbiol Biotech*, 9, 317-327.
- Fernández-Lucas J., Harris R., Mata-Casar I., Heras A., Mata I. y Arroyo M. (2013) "Magnetic chitosan beads for covalent immobilization of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase: Application in nucleoside analogues synthesis" *J Ind Microbiol Biot*, 40, 955-966.
- Fleischmann R., Adams M., White O., Clayton R., Kirkness E., Kerlavage A., Bult C., Tomb J., Dougherty B. y Merrick J. (1995) "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd" *Science*, 269, 496-512.
- Frazzetto G. (2003) "White Biotechnology" *EMBO Rep*, 4, 835-837.
- French S. y Wilson K. (1978) "On the treatment of negative intensity observations" *Acta Crystallogr*, A34, 517-525.
- Fresco-Taboada A., de la Mata I., Arroyo M. y Fernández-Lucas J. (2013a) "New insights on nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases: a versatile biocatalyst for one-pot one-step synthesis of nucleoside analogs" *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 3773-3785.
- Fresco-Taboada A., del Cerro C., Fernández-Lucas J., Arroyo M., Acebal C., García J.L. y de la Mata I. (2013b) "Genome of the psychrophilic bacterium *Bacillus psychrosaccharolyticus*, a potential source of 2'-deoxyribosyltransferase for industrial nucleoside synthesis" *Genome Announc*, 1, e00309-00313.
- Fresco-Taboada A., Serra I., Fernández-Lucas J., Acebal C., Arroyo M., Terreni M. y de la Mata I. (2014) "Nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase from psychrophilic bacterium *Bacillus psychrosaccharolyticus* - Preparation of an immobilized biocatalyst for the enzymatic synthesis of therapeutic nucleosides" *Molecules*, 19, 11231-11249.
- Fuentes M., Maquiese J.V., Pessela B.C.C., Abian O., Fernández-Lafuente R., Mateo C. y Guisán J.M. (2004a) "New cationic exchanger support for reversible immobilization of proteins" *Biotechnol Progr*, 20, 284-288.
- Fuentes M., Pessela B.C.C., Maquiese J.V., Ortiz C., Segura R.L., Palomo J.M., Abian O., Torres R., Mateo C., Fernández-Lafuente R. y Guisán J.M. (2004b) "Reversible and strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran" *Biotechnol Progr*, 20, 1134-1139.
- Gaevaya L. (1980) "Immobilisation of N-deoxyribosyltransferase" *Chem Abs*, 93, 21636.

- Gao F. y Ma G.** (2012) "Effects of microenvironment on supported enzymes" *Top Catal*, 55, 1114-1123.
- García-Junceda E., García-García J.F., Bastida A. y Fernández-Mayoralas A.** (2004) "Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: The prodigious decades" *Bioorgan Med Chem*, 12, 1817-1834.
- Geourjon C. y Deléage G.** (1995) "SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments" *Comput Appl Biosci*, 11, 681-684.
- Gill P., Moghadam T.T. y Ranjbar B.** (2010) "Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience" *J Biomol Tech*, 21, 167-193.
- Graumann P. y Marahiel M.A.** (1996) "Some like it cold: response of microorganisms to cold shock" *Arch Microbiol*, 166, 293-300.
- Guibault G., Kaufmann J. y Patriarche G.** (1991) "Immobilized enzyme electrodes as biosensors." En *Protein Immobilization. Fundamentals and applications*, 209-262, Marcel Dekker.
- Guisán J., Penzol G., Armisen P., Bastida A., Blanco R., Fernandez-Lafuente R. y García-Junceda E.** (1997) "Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates" En *Immobilization of Enzymes and Cells*, Vol. 1, 261-275, Humana Press.
- Guisán J.M.** (1988) "Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes" *Enzyme Microb Tech*, 10, 375-382.
- Guisán J.M., Bastida A., Blanco R.M., Fernández-Lafuente R. y García-Junceda E.** (1996) "Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose" En *Immobilization of Enzymes and Cells*, Vol. 1, 277-287, Humana Press.
- Guzmán E., Romeu A. y Garcia-Vallve S.** (2008) "Completely sequenced genomes of pathogenic bacteria: A review" *Enferm Infecc Micr Cl*, 26, 88-98.
- Hall T.A.** (1999) "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT" *Nucleic Acids Res*, 41, 95-98.
- Hamamoto T., Okuyama K., Noguchi T. y Midorikawa Y.** (1997) "Cloning and expression of purine nucleoside phosphorylase I gene from *Bacillus stearothermophilus* TH 6-2" *Biosci Biotech Bioch*, 61, 272-275.
- Hassan A.E.A., Shortnacy-Fowler A.T., Montgomery J.A. y Secrist J.A.** (2000) "A convenient synthesis of 2'-deoxy-2-fluoroadenosine; a potential prodrug for suicide gene therapy" *Nucleos Nucleot Nucl*, 19, 559-565.
- Henley J.P. y Sadana A.** (1985) "Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism" *Enzyme Microb Tech*, 7, 50-60.
- Hicks N. y Hutchinson D.W.** (1994) "Synthesis of nucleoside analogs using immobilized N-deoxyribosyltransferases" *Biocatalysis*, 11, 1-7.
- Holguin J. y Cardinaud R.** (1975a) "Trans-N-deoxyribosylase: purification by affinity chromatography and characterization" *Eur J Biochem*, 54, 505-514.
- Holguin J., Cardinaud R. y Salemink C.A.** (1975b) "Trans-N-Deoxyribosylase: substrate specificity studies" *Eur J Biochem*, 54, 515-520.
- Hormigo D., Garcia-Hidalgo J., Acebal C., de la Mata I., Arroyo M.** (2012) "Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of recombinant poly-3-hydroxybutyrate depolymerase from *Streptomyces exfoliatus*" *Bioresour Technol*, 115, 177-182.
- Horton H., Moran L., Ochs R., Rawn J. y Scrimgeour K.** (1996) "Principles of Biochemistry", Prentice-Hall International.
- Hoyoux A., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Huston A., Marx J., Sonan G., Zeng Y., Feller G. y Gerday C.** (2004) "Extreme catalysts from low-temperature environments" *J Biosci Bioeng*, 98, 317-330.
- Huang M.C., Montgomery J.A., Thorpe M.C., Stewart E.L., Secrist J.A. y Blakley R.L.** (1983) "Formation of 3-(2'-deoxyribofuranosyl) and 9-(2'-deoxyribofuranosyl) nucleosides of 8-



- substituted purines by nucleoside deoxyribosyltransferase" *Arch Biochem Biophys*, 222, 133-144.
- Jordheim L.P., Durantel D., Zoulim F. y Dumontet C.** (2013) "Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases" *Nat Rev Drug Discov*, 12, 447-464.
- Kabsch W.** (2010) "XDS" *Acta Crystallogr*, D66, 125-132.
- Kaminski P., Dugue L. y Pochet S.** (2008a) "Expanding substrate specificity of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase" *Nucl Acid Symp Ser*, 52, 495-496.
- Kaminski P.A.** (2002) "Functional cloning, heterologous expression, and purification of two different N-deoxyribosyltransferases from *Lactobacillus helveticus*" *J Biol Chem*, 277, 14400-14407.
- Kaminski P.A., Dacher P., Dugue L. y Pochet S.** (2008b) "In vivo reshaping the catalytic site of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase for dideoxy- and didehydronucleosides via a single amino acid substitution" *J Biol Chem*, 283, 20053-20059.
- Kang H., Heo D., Choi S., Kim K., Shim J., Kim C., Sung H. y Yun C.** (2007) "Functional characterization of Hsp33 protein from *Bacillus psychrosaccharolyticus*; additional function of HSP33 on resistance to solvent stress" *Biochem Biophys Res Commun*, 358, 743-750.
- Kieser K., Chater K., Bibb M., Buttner M. y Hopwood D.** (2000) "Practical *Streptomyces* genetics", The John Innes Foundation.
- Klibanov A.** (1983) "Immobilized enzymes and cells as practical catalysts" *Science*, 219, 722-727.
- Koshland D.** (1953) "Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions" *Biol Rev Camb Phil Soc*, 28, 416-436.
- Kouisni L. y Rochefort D.** (2009) "Confocal microscopy study of polymer microcapsules for enzyme immobilisation in paper substrates" *J Appl Polym Sci*, 111, 1-10.
- Laemmli U.K.** (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature*, 227, 680-685.
- Lairson L.L., Henrissat B., Davies G.J. y Withers S.G.** (2008) "Glycosyltransferases: Structures, functions, and mechanisms" *Annu Rev Biochem*, 77, 521-555.
- Lalonde J. y Margolin A.** (2002) "Immobilization of enzymes" En *Enzyme catalysis in organic chemistry*, Vol. 163-184, Wiley-VCH.
- Larkin J.M. y Stokes J.L.** (1967) "Taxonomy of psychrophilic strains of *Bacillus*" *J Bacteriol*, 94, 889-895.
- Lawrence K.A., Jewett M.W., Rosa P.A. y Gherardini F.C.** (2009) "*Borrelia burgdorferi* bb0426 encodes a 2'-deoxyribosyltransferase that plays a central role in purine salvage" *Mol Microbiol*, 72, 1517-1529.
- Lebedev A., Vagin A. y Murshudov G.** (2006) "Intensity statistics in twinned crystals with examples from the PDB" *Acta Crystallogr*, D62, 83-95.
- Lewkowicz E.S. y Iribarren A.M.** (2006) "Nucleoside phosphorylases" *Curr Org Chem*, 10, 1197-1215.
- Leyssen P., De Clercq E. y Neyts J.** (2008) "Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses" *Antivir Res*, 78, 9-25.
- Li N., Smith T.J. y Zong M.-H.** (2010) "Biocatalytic transformation of nucleoside derivatives" *Biotechnol Adv*, 28, 348-366.
- Lim J., Thomas T. y Cavicchioli R.** (2000) "Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*" *J Mol Biol*, 297, 553-567.
- Lin Y., Zhang W., Zhu F., Su J., Fang D., Yang Y., Zhang G., Xie L., Zhang R. y Wang H.** (2011) "Subcellular localization of N-deoxyribosyltransferase in *Lactobacillus fermentum*: Cell surface association of an intracellular nucleotide metabolic enzyme" *FEMS Microbiol Lett*, 323, 132-141.
- Liu L., Li Y., Zhang J., Zou W., Zhou Z., Liu J., Li X., Wang L. y Chen J.** (2011) "Complete genome sequence of the industrial strain *Bacillus megaterium* WSH-002" *J Bacteriol*, 193, 6389-6390.

- Lorenz P. y Zinke H.** (2005) "White biotechnology: Differences in US and EU approaches?" *Trends Biotechnol*, 23, 570-574.
- Luo W., Liu Y., Zhu X., Zhao W., Huang L., Cai J., Xu Z. y Cen P.** (2011) "Cloning and characterization of purine nucleoside phosphorylase in *Escherichia coli* and subsequent ribavirin biosynthesis using immobilized recombinant cells" *Enzyme Microb Technol*, 48, 438-444.
- Macnutt W.S.** (1952) "The enzymically catalysed transfer of the deoxyribosyl group from one purine or pyrimidine to another" *Biochem J*, 50, 384-397.
- Madigan M., Martinko J., Stahl D. y Clark D.** (2012) "Brock Biology of microorganisms", Benjamin Cummings.
- Marchler-Bauer A., Zheng C., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Geer L.Y., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz D.I., Lanczycki C.J., Lu F., Lu S., Marchler G.H., Song J.S., Thanki N., Yamashita R.A., Zhang D. y Bryant S.H.** (2013) "CDD: Conserved domains and protein three-dimensional structure" *Nucleic Acids Res*, 41, D348-D352.
- Mateo C., Abian O., Fernandez-Lafuente R. y Guisan J.M.** (2000) "Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites" *Biotechnol Bioeng*, 68, 98-105.
- Mateo C., Abian O., Fernández-Lorente G., Pedroche J., Fernández-Lafuente R., Guisan J., Tam A. y Daminati M.** (2002) "Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment" *Biotechnol Progr*, 18, 629-634.
- Mateo C., Palomo J.M., Fuentes M., Betancor L., Grazu V., López-Gallego F., Pessela B.C.C., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Fernández-Lafuente R. y Guisán J.M.** (2006a) "Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins" *Enzyme Microb Technol*, 39, 274-280.
- Mateo C., Pessela B.C., Fuentes M., Torres R., Betancor L., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Fernandez-Lafuente R. y Guisan J.** (2006b) "Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and further cross-linking with aldehyde-dextran" En *Immobilization of Enzymes and Cells*, Vol. 22, 129-141, Humana Press.
- Mateo C., Pessela B.C., Fuentes M., Torres R., Ortiz C., López-Gallego F., Betancor L., Alonso-Morales N., Guisan J. y Fernandez-Lafuente R.** (2006c) "Very strong but reversible immobilization of enzymes on supports coated with ionic polymers" En *Immobilization of Enzymes and Cells*, Vol. 22, 205-216, Humana Press.
- Mathews C., van Holde K. y Ahern K.** (2002) "Biochemistry", Benjamin Cummings.
- McCarter J. y Withers S.** (1994) "Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis" *Curr Opin Struct Biol*, 4, 885-892.
- McCoy A., Grosse-Kunstleve R., Adams P., Winn M., Storoni L. y Read R.** (2007) "Phaser crystallographic software" *J Appl Crystallogr*, 40, 658-674.
- McGuffin L.J., Bryson K. y Jones D.T.** (2000) "The PSIPRED protein structure prediction server" *Bioinformatics*, 16, 404-405.
- Medigue C., Krin E., Pascal G., Barbe V., Bernsel A., Bertin P.N., Cheung F., Cruveiller S., D'Amico S., Duilio A., Fang G., Feller G., Ho C., Mangenot S., Marino G., Nilsson J., Parrilli E., Rocha E.P.C., Rouy Z., Sekowska A., Tutino M.L., Vallenet D., von Heijne G. y Danchin A.** (2005) "Coping with cold: The genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125" *Genome Res*, 15, 1325-1335.
- Mikhailopulo I.A.** (2007) "Biotechnology of nucleic acid constituents - State of the art and perspectives" *Curr Org Chem*, 11, 317-333.
- Mikhailopulo I.A. y Miroshnikov A.I.** (2011) "Biologically important nucleosides: Modern trends in biotechnology and application" *Mendeleev Commun*, 21, 57-68.
- Minton A., Jaenicke R. y Durchschlag H.** (1997) "Alternative strategies for the characterization of associations in multicomponent solutions via measurement of sedimentation equilibrium" En *Analytical Ultracentrifugation IV*, Vol. 107, 11-19, Springer Berlin / Heidelberg.


- Mitsiki E., Papageorgiou A.C., Iyer S., Thiyagarajan N., Prior S.H., Sleep D., Finnis C., Acharya K.R. (2009) "Structures of native human thymidine phosphorylase and in complex with 5-iodouracil" *Biochem Biophys Res Commun* Vol. 386, 666-670.
- Miyamoto Y., Masaki T. y Chohnan S. (2007) "Characterization of N-deoxyribosyltransferase from *Lactococcus lactis subsp lactis*" *BBA-Proteins Proteomics*, 1774, 1323-1330.
- Molina-Arcas M., Casado F.J. y Pastor-Anglada M. (2009) "Nucleoside transporter proteins" *Curr Vasc Pharmacol*, 7, 426-434.
- Moolman F., Brady D., Sewlall A., Rolfes H. y Jordaan J. (2005), Vol. WO/2005/080561.
- Morita R.Y. (1975) "Psychrophilic bacteria" *Bacteriol Rev*, 39, 144-167.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. y Erlich H. (1986) "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction" *Cold Spring Harb Sym*, 51, 263-273.
- Nandakumar R. y Mattiasson B. (1999) "Affinity isolation of a cold-adapted enzyme: Lactate dehydrogenase from *Bacillus psychrosaccharolyticus*" *Bioseparation*, 7, 327-331.
- Newman J., Egan D., Walter T., Meged R., Berry I., Ben Jelloul M., Sussman J., Stuart D. y Perrakis A. (2005) "Towards rationalization of crystallization screening for small- to medium-sized academic laboratories: The PACT/JCSG+ strategy" *Acta Crystallogr D*, 61, 1426-1431.
- Nolasco D.O., Canduri F., Pereira J.H., Cortinó J.R., Palma M.S., Oliveira J.S., Basso L.A., de Azevedo Jr W.F. y Santos D.S. (2004) "Crystallographic structure of PNP from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9 Å resolution" *Biochem Biophys Res Commun*, 324, 789-794.
- Núñez de Castro I. (2012) "Enzimología", Pirámide.
- O'Driscoll K. (1976) "Techniques of enzyme entrapment in gels" En *Methods in enzymology*, Vol. 44, 169-183, Academic Press.
- Okubo Y., Yokoigawa K., Esaki N., Soda K. y Kawai H. (1999) "Characterization of psychrophilic alanine racemase from *Bacillus psychrosaccharolyticus*" *Biochem Biophys Res Commun* 6, 256, 333-340.
- Okuyama K., Shibuya S., Hamamoto T. y Noguchi T. (2003) "Enzymatic synthesis of 2'-deoxyguanosine with nucleoside deoxyribosyltransferase-II" *Biosci Biotech Bioch*, 67, 989-995.
- Padilla J. y Yeates T. (2003) "A statistic for local intensity differences: Robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning" *Acta Crystallogr*, D59, 1124-1130.
- Pandiyan A. y Ray M. (2013) "Draft genome sequence of the antarctic psychrophilic bacterium *Pseudomonas syringae* strain Lz4W" *Genome Announc*, 1, e00377-13.
- Parker W.B. (2009) "Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer" *Chem Rev*, 109, 2880-2893.
- Parker W.B., Allan P.W., Hassan A.E.A., Secrist Iii J.A., Sorscher E.J. y Waud W.R. (2003) "Antitumor activity of 2-fluoro-2'-deoxyadenosine against tumors that express *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase" *Cancer Gene Ther*, 10, 23-29.
- Pessela B.C.C., Mateo C., Fuentes M., Vian A., García J.L., Carrascosa A.V., Guisán J.M. y Fernández-Lafuente R. (2004) "Stabilization of a multimeric  $\beta$ -galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2 by immobilization on novel heterofunctional epoxy supports plus aldehyde-dextran cross-linking" *Biotechnol Progr*, 20, 388-392.
- Pilipenko O.S., Atyaksheva L.F., Poltorak O.M. y Chukhrai E.S. (2007) "Dissociation and catalytic activity of oligomer forms of  $\beta$ -galactosidases" *Russ J Phys Chem A*, 81, 990-994.
- Pochet S., Dugue L., Meier A. y Marliere P. (1995) "Enzymatic synthesis of 1-(2-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)imidazole-4-carboxamide, a simplified DNA building block" *Bioorg Med Chem Lett*, 5, 1679-1684.
- Porter D.J.T., Merrill B.M. y Short S.A. (1995) "Identification of the active site nucleophile in nucleoside 2-deoxyribosyltransferase as glutamic acid 98" *J Biol Chem*, 270, 15551-15556.
- Prokofev I., Lashkov A., Gabdoulkhakov A., Dontsova M., Seregina T., Mironov A., Betzel C. y Mikhailov A. (2014) "Crystallization and preliminary x-ray study of *Vibrio cholerae* uridine phosphorylase in complex with 6-methyluracil" *Acta Crystallogr F*, 70, 60.

- Pugmire M.J. y Ealick S.E.** (2002) "Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases" *Biochem J*, 361, 1-25.
- Rabus R., Ruepp A., Frickey T., Rattei T., Fartmann B., Stark M., Bauer M., Zibat A., Lombardot T., Becker I., Amann J., Gellner K., Teeling H., Leuschner W.D., Glockner F.O., Lupas A.N., Amann R. y Klenk H.P.** (2004) "The genome of *Desulfotalea psychrophila*, a sulfate-reducing bacterium from permanently cold Arctic sediments" *Environ Microbiol*, 6, 887-902.
- Reetz M. y Jaeger K.** (1998) "Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas lipases*" *Chem Phys Lipids*, 93, 3-14.
- Rocchietti S., Ubiali D., Terreni M., Albertini A.M., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. y Pregnotato M.** (2004) "Immobilization and stabilization of recombinant multimeric uridine and purine nucleoside phosphorylases from *Bacillus subtilis*" *Biomacromolecules*, 5, 2195-2200.
- Sambrook J. y Russell D.** (2001) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R.** (1977) "DNA sequencing with chain terminating inhibitors" *P Natl Acad Sci USA*, 72, 5463-5464.
- Saunders N.F.W., Thomas T., Curmi P.M.G., Mattick J.S., Kuczek E., Slade R., Davis J., Franzmann P.D., Boone D., Rusterholtz K., Feldman R., Gates C., Bench S., Sowers K., Kadner K., Aerts A., Dehal P., Detter C., Glavina T., Lucas S., Richardson P., Larimer F., Hauser L., Land M. y Cavicchioli R.** (2003) "Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*" *Genome Res*, 13, 1580-1588.
- Seo J.B., Kim H.S., Jung G.Y., Nam M.H., Chung J.H., Kim J.Y., Jong S.Y., Kim C.W. y Kwon O.** (2004) "Psychrophilicity of *Bacillus psychrosaccharolyticus*: A proteomic study" *Proteomics*, 4, 3654-3659.
- Serra I., Bavaro T., Cecchini D.A., Daly S., Albertini A.M., Terreni M. y Ubiali D.** (2013a) "A comparison between immobilized pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Bacillus subtilis* and thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* in the synthesis of 5-substituted pyrimidine 2'-deoxyribonucleosides" *J Mol Catal B: Enzym*, 95, 16-22.
- Serra I., Serra C.D., Rocchietti S., Ubiali D. y Terreni M.** (2011) "Stabilization of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* by immobilization and post immobilization techniques" *Enzyme Microb Tech*, 49, 52-58.
- Serra I., Ubiali D., Piskur J., Christoffersen S., Lewkowicz E.S., Iribarren A.M., Albertini A.M. y Terreni M.** (2013b) "Developing a collection of immobilized nucleoside phosphorylases for the preparation of nucleoside analogues: Enzymatic synthesis of arabinosyladenine and 2,3-dideoxyinosine" *Chem Plus Chem*, 78, 157-165.
- Sheldon R.A.** (2007) "Enzyme immobilization: The quest for optimum performance" *Adv Synth Catal*, 349, 1289-1307.
- Short S., Armstrong S., Ealick S. y Porter D.** (1996) "Active site amino acids that participate in the catalytic mechanism of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase" *J Biol Chem*, 271, 4978-4987.
- Slater M.J., Gowrie C., Freeman G.A. y Short S.A.** (1996) "Enzymatic synthesis and antiviral activity of 2'-deoxy-2'-fluoro-ribavirin" *Bioorg Med Chem Lett*, 6, 2787-2790.
- Söding J., Biegert A. y Lupas A.N.** (2005) "The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction" *Nucleic Acids Res*, 33, W244-248.
- St Clair N. y Navia M.** (1992) "Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts" *J Am Chem Soc*, 114, 7314-7316.
- Steenkamp D.J.** (1991) "The purine-2'-deoxyribonucleosidase from *Crithidia luciliae*" *Eur J Biochem*, 197, 431-439.
- Su F., Hua D., Zhang Z., Wang X., Tang H., Tao F., Tai C., Wu Q., Wu G. y Xu P.** (2011) "Genome sequence of *Bacillus pumilus* S-1, an efficient isoeugenol-utilizing producer for natural vanillin" *J Bacteriol*, 193, 6400-6401.

- Suzuki N., Nakagawa F., Nukatsuka M. y Fukushima M.** (2011) "Trifluorothymidine exhibits potent antitumor activity via the induction of DNA double-strand breaks" *Exp Ther Med*, 2, 393-397.
- Taran S.A., Verevkin K.N., Feofanov S.A. y Miroshnikov A.I.** (2009) "Enzymatic transglycosylation of natural and modified nucleosides by immobilized thermostable nucleoside phosphorylases from *Geobacillus stearothermophilus*" *Russ J Bioorg Chem*, 35, 739-745.
- Taylor R.** (1991) "Protein immobilization: Fundamentals and applications", New York.
- Terreni M., Ubiali D., Bavaro T., Cecchini D.A. y Serra I.** (2008) "Bioprocesses for the synthesis of nucleosides and nucleotides" En *Biocatalysis research progress*, 47-94, Nova Science.
- Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T.J.** (1994) "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice" *Nucleic Acids Res*, 22, 4673-4680.
- Timofeev V.I., Abramchik Y.A., Fateev I.V., Zhukhlistova N.E., Murav'eva T.I., Kuranova I.P. y Esipov R.S.** (2013) "Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *E. coli* in complex with 3'-azido-2'-fluoro-2',3'-dideoxyuridine" *Crystallogr Rep*, 58, 842-853.
- Tosa T., Mori T., Fuse N. y Chibata I.** (1966) "Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase" *Enzymologia*, 31, 214-224.
- Ubiali D., Rocchietti S., Scaramozzino F., Terreni M., Albertini A.M., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. y Pregnolato M.** (2004) "Synthesis of 2'-deoxynucleosides by transglycosylation with new immobilized and stabilized uridine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase" *Adv Synth Catal*, 346, 1361-1366.
- Ubiali D., Serra C.D., Serra I., Morelli C.F., Terreni M., Albertini A.M., Manitto P. y Speranza G.** (2012) "Production, characterization and synthetic application of a purine nucleoside phosphorylase from *Aeromonas hydrophila*" *Adv Synth Catal*, 354, 96-104.
- Winn M., Ballard C., Cowtan K., Dodson E., Emsley P., Evans P., Keegan R., Krissinel E., Leslie A., McCoy A., McNicholas S., Murshudov G., Pannu N., Potterton E., Powell H., Read R., Vagin A. y Wilson K.** (2011) "Overview of the CCP4 suite and current developments" *Acta Crystallogr D*, 67, 235-242.
- Xiong Z., Jiang Y., Qi D., Lu H., Yang F., Yang J., Chen L., Sun L., Xu X., Xue Y., Zhu Y. y Jin Q.** (2009) "Complete genome sequence of the extremophilic *Bacillus cereus* strain Q1 with industrial applications" *J Bacteriol*, 191, 1120-1121.
- Xu D. y Zhang Y.** (2012) "Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field" *Proteins*, 80, 1715-1735.
- Yadav T., Carrasco B., Myers A.R., George N.P., Keck J.L. y Alonso J.C.** (2012) "Genetic recombination in *Bacillus subtilis*: A division of labor between two single-strand DNA-binding proteins" *Nucleic Acids Res*, 40, 5546-5559.
- Yang H., Liao Y., Wang B., Lin Y. y Pan L.** (2011) "Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* XH7, which exhibits production of purine nucleosides" *J Bacteriol*, 193, 5593-5594.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. y Messing J.** (1985) "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors" *Gene*, 33, 103-119.
- Yin J., Chen J., Liu G., Yu Y., Song L., Wang X. y Qu X.** (2013) "Complete genome sequence of *Glaciecola psychrophila* strain 170T" *Genome Announc*, 1, e00199-13.
- Yukiko M., Taheharu M. y Shigeru C.** (2007) "Characterization of N-deoxyribosyltransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*" *Biochim Biophys Acta*, 1774, 1323-1330.
- Zhang Y.** (2008) "I-TASSER server for protein 3D structure prediction" *BMC Bioinformatics*, 9, 40.
- Zuffi G., Ghisotti D., Oliva I., Capra E., Frascotti G., Tonon G. y Orsini G.** (2004) "Immobilized biocatalysts for the production of nucleosides and nucleoside analogues by enzymatic transglycosylation reactions" *Biocatal Biotransform*, 22, 25-33.

**Zhiyong W., Xulu C., Xu Y., Li P., Jun D.** (2014) "Draft genome sequence of *Polaromonas glacialis* strain R3-9, a psychrotolerant bacterium isolated from Arctic glacial foreland" *Genome Announc*, 2, e00695-14.





## **VII. SUMMARY FOR THE EUROPEAN DOCTORATE MENTION**





## **“NUCLEOSIDE 2'-DEOXYRIBOSYLTRANSFERASE FROM *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074”**

### **I. INTRODUCTION**

Nucleoside analogues are molecules that display antiviral and antitumoral activity, and can be used as starting materials for antisense oligonucleotides. Modified nucleosides have always been synthesized by chemical methods, requiring multistep processes of protection-deprotection reactions. Enzymatic synthesis of nucleoside analogues by 2'-deoxyribosyltransferases (NDTs) (E.C. 2.4.2.6) is an interesting alternative to the chemical method since very mild reaction conditions are used, and stereo- and regioselectivity are achieved. Nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases catalyze the exchange of 2'-deoxyribose between the purine or pyrimidine bases of 2'-deoxyribonucleosides and free purine or pyrimidine bases. These enzymes are classified into two classes depending on their substrate specificity: DRT type I (PDT) specific for purines ( $\text{Pur} \leftrightarrow \text{Pur}$ ) and DRT type II (NDT), which catalyzes the transfer between purines and/or pyrimidines ( $\text{Pur} \leftrightarrow \text{Pur}$ ,  $\text{Pur} \leftrightarrow \text{Pyr}$ ,  $\text{Pyr} \leftrightarrow \text{Pyr}$ ).

Psychrotrophic or psychrotolerant microorganisms present their highest growth rate at 20-40 °C, although they grow fairly well at temperatures close to 0 °C. The term psychrotolerant also encompasses mesophilic species which manage to survive at low temperatures. An example of psychrotolerant bacteria is *Bacillus psychrosaccharolyticus* (CECT 4074, ATCC 23296, DSM 6), a facultative anaerobic Gram-positive bacterium, which can be found in soil and lowland marshes. Nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase activity has been reported in *Bacillus psychrosaccharolyticus* cells.

Enzyme immobilization is a requisite for the industrial application of enzymes, since immobilized enzymes retain catalytic activity and can be recycled. Immobilization techniques can be classified into physical retention or chemical attachment depending on the enzyme-carrier interaction. Enzyme immobilization can alter enzyme's behaviour, stability is generally increased whereas activity is normally diminished.

## II. OBJECTIVES

The purpose of this Doctoral Thesis has been the study of the nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase from a psychrotrophic microorganism, *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074. To achieve this general aim, different objectives were established:

1. Identification, cloning and overexpression of the gene that codifies the nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase from *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 (*Bp*NDT).
2. Production and purification of *Bp*NDT. Determination of the type of DRT.
3. Biochemical characterization of *Bp*NDT: effect of temperature, pH, ionic strength and cations on enzyme activity and stability. Thermostability.
4. Substrate specificity: synthesis of natural and non-natural nucleosides. Determination of the kinetic mechanism.
5. Structural characterization of *Bp*NDT: tertiary and quaternary structure, oligomeric state and molecular mass determination.
6. Identification of the chemical mechanism. Identification of the active site residues using site-directed mutagenesis.
7. Immobilization of *Bp*NDT and application of the immobilized biocatalyst in therapeutic nucleoside analogues synthesis.

## III. RESULTS

1. Identification, cloning, expression and purification of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase from *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074

*Bacillus psychrosaccharolyticus* genome was sequenced and the *ndt* gene that codifies a putative DRT was identified in its genome. This *ndt* gene was cloned into pET28a(+), overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified through three chromatographic steps: anionic-exchange chromatography, molecular size exclusion chromatography, and isofocusing chromatography. As result of the purification process, a total of 9.8 mg of pure *Bp*NDT per L of broth was obtained. A single protein band with an apparent molecular mass of 16 kDa was detected by SDS-PAGE.

## 2. Biochemical characterization of recombinant *Bp*NDT

*Bp*NDT has been classified as a DRT type II (NDT) since it could catalyze the transfer of 2'-deoxyribonucleosides between both purines and pyrimidines.

The determination of the optimal conditions for activity of pure *Bp*NDT included studies of the influence of pH, ionic strength (*I*) and temperature on enzyme activity and stability. The enzyme was stable in a pH range from 6,0 to 9,0 and it showed optimal activity at pH 8,0. Highest activity was maintained up to 1,0 M NaCl, whereas activity decreased 25 % in presence of 1,5 M NaCl.

As far as temperature is concerned, the *Bp*NDT activity was studied in the range from 4 to 80 °C, being most active at 50 °C and stable only up to the same temperature. Thermal deactivation kinetics were determined, *Bp*NDT was stable at 40 °C and 50 °C for at least 96 h whilst at 60 °C and 70 °C, deoxyribosyltransferase residual activity diminished following a single exponential decay.

Likewise, the study of the effect of several cations on enzyme activity demonstrated that only  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  showed an inhibitory effect on *Bp*NDT activity.

## 3. Nucleoside synthesis

*Bp*NDT accepted different natural and non-natural bases but it showed steady preference for purines as base acceptors (Hyp>Ade>Cyt>Thy≈Ura) and pyrimidine nucleosides as donors (dCyd>dUrd≈Thd≈dAdo>dGua>dIno). Non-natural nucleoside synthesis was also carried out by *Bp*NDT, obtaining different halogenated nucleosides and modified purines, some of them synthesized for the first time by an NDT enzyme.

## 4. Structural characterization of recombinant *Bp*NDT

Analytical ultracentrifugation studies indicated that *Bp*NDT has a molecular mass of  $91,400 \pm 400$  Da, compatible with a homohexameric state. Far UV-Vis circular dichroism spectra determined the secondary structure of the enzyme, 35,6 %  $\alpha$ -helix, 16 %  $\beta$ -sheet, 16,6 %  $\beta$ -turns and 31,6 % random coil. Circular dichroism, fluorescence and differential scanning calorimetry (DSC) experiments were used for the determination of the  $T_m$ , 49 °C. The structure of *Bp*NDT has been determined by crystallization using the molecular replacement method, with the atomic coordinates of 2'-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus helveticus* (PDB code 1s2d) as the search model. The asymmetric unit is made up of two *Bp*NDT antiparalel

polypeptide chains which form a closely packed dimeric assembly. Additionally, three dimeric structures associate around the crystallographic 3-fold axis forming a hexamer which can then be described as a trimer of dimers. Each dimer presents two active sites, each of them composed by amino acids from the two subunits of the dimer.

## 5. Catalytic mechanism of BpNDT

Kinetic parameters of *Bp*NDT for the synthesis of deoxyadenosine from deoxycytidine and adenine were determined. *Bp*NDT follows a Ping-Pong Bi-Bi mechanism where a glycosyl-enzyme intermediate is formed. The active site is formed by Tyr<sup>5</sup>, Gln<sup>40</sup>, Asp<sup>59</sup>, Asp<sup>79</sup> and Glu<sup>85</sup> from subunit one and Asn<sup>107</sup> and Lys<sup>142</sup> from subunit two of the dimer. *Bp*NDT performs acid/base catalysis, where nucleophile Glu<sup>85</sup> attacks C1' of the 2'-deoxyribose whereas Asp<sup>59</sup> residue acts as acid in the first semireaction, protonating the leaving base, and as base in the second semireaction.

## 6. *Bp*NDT immobilization

After attempting different immobilization strategies, *Bp*NDT was successfully immobilized by ionic adsorption on PEI (600 Da)-glyoxyl-agarose and further cross-linked with aldehyde-dextran (20 kDa, 70 % oxidation) to prevent protein leakage. This immobilized biocatalyst could be recycled for at least 30 consecutive cycles in the synthesis of 2'-deoxyadenosine from 2'-deoxyuridine and adenine, reached its maximal activity at 60 °C and could synthesize two therapeutic nucleoside analogues, 5-trifluorothymidine and 5-aza-2'-deoxycytidine, using 30 and 10 mM substrates respectively.

## IV. CONCLUSIONS

1. Despite being defined as a psychrophilic microorganism, *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 should be classified as psychrotolerant, because it reaches its optimal growth at a higher temperature than 15 °C (28 °C) although it is able to grow at 0 °C. Furthermore, genomic DNA from *Bacillus psychrosaccharolyticus* has been sequenced. It is the first genome from a psychrotolerant microorganism from the *Bacillus* genus, allowing identification of hypothetical genes codifying for proteins involved in cold-shock response, such as elongation factors G, Ts, Tu, LepA and P, or 6 ATP-dependent RNA helicases.

2. *Bpndt* gene codifies the nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase from *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074 (*Bp*NDT). This enzyme has been classified as a DRT type II, since it catalyzes the 2'-deoxyribosyl transfer between purines and/or pyrimidines.
3. *Bp*NDT is a psychrotolerant enzyme that presents activity under 20 °C, a melting temperature of 49 °C and is stable at 50 °C for at least 96 h. Optimal conditions for *Bp*NDT transferase activity are 40 °C and pH 8 in absence of any cation.
4. *Bp*NDT is a homohexamer of 91.4 kDa that can be described as a trimer of dimers, composed by 36 % of  $\alpha$ -helix, 16 % of  $\beta$ -sheet and 16 % of  $\beta$ -turns. Each dimer, consisting of 2 antiparalel subunits, presents two active sites, each one formed by residues from both subunits of the dimer; Tyr<sup>5</sup>, Gln<sup>40</sup>, Asp<sup>59</sup>, Asp<sup>79</sup> and Glu<sup>85</sup> from one of them, and Asn<sup>107</sup> and Lys<sup>142</sup> from the other.
5. *Bp*NDT presents a Ping-Pong Bi-Bi kinetic mechanism where a glycosyl-enzyme intermediate is formed. Regarding its chemical mechanism, *Bp*NDT performs acid-base catalysis, nucleophile Glu<sup>85</sup> attacks C1' of the 2'-deoxyribose whereas an acid residue, which could be Asp<sup>59</sup>, acts as acid in the first semireaction, protonating the leaving base, and as base in the second semireaction.
6. Regarding natural nucleoside synthesis, *Bp*NDT prefers purine bases as acceptors (Hyp>Ade>Cyt>Thy≈Ura) and pyrimidine nucleosides as donors (dCyd>dUrd≈Thd≈dAdo>dGua>dIno). Concerning non-natural nucleoside synthesis, *Bp*NDT recognizes modified bases but not nucleoside donors with modifications in the 2'-deoxyribosyl group, with the exception of 2'-fluoro-2'-deoxyuridine. Similar to natural substrates, *Bp*NDT recognizes better bulky modified bases due to active core conformation, situated between type I and type II NDTs.
7. *Bp*NDT is able to synthesize therapeutic nucleoside analogs such as trifluridine, decytabine, floxuridine, 2'-fluoro-2'-deoxycytidine or 2-fluoro-2'-deoxyadenosine. 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, 2-fluoro-2'-deoxyadenosine, 7-deaza-6-hydroxypurine-2'-deoxyriboside and theophylline-2'-deoxyriboside were synthesized for the first time by a NDT.
8. *Bp*NDT was immobilized on PEI 600 Da-functionalized glyoxyl-agarose and further cross-linked with 70 % oxidized 20 kDa dextran. This immobilized biocatalyst can be recycled for at least 30 cycles of transglycosylation reaction, reaches maximal activity at 60 °C and it has been employed for the synthesis of two therapeutic non-natural nucleosides, 5-trifluorothymidine (trifluridine) and 5-aza-2'-deoxycytidine (decytabine).

